Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Fachabteilung Produktionshygiene
Leitung: Professor Dr. W. Gedek

vorgelegt über
Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)

Zur in Vitro-Wirkungsintensität von Betalaktam-Antibiotika in Sekreten des trockenstehenden Euters

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Birgitt Marx
aus Hofheim

München 1979

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Fachabteilung Produktionshygiene
Leitung: Professor Dr. W. Gedek

vorgelegt über
Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)

Zur in Vitro-Wirkungsintensität von Betalaktam-Antibiotika in Sekreten des trockenstehenden Euters

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Birgitt Marx
aus Hofheim

München 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

MEINEN ELTERN UND GROSSELTERN IN DANKBARKEIT

GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0041

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	BETALAKTAM-ANTIBIOTIKA	2
2.1.1	Chemische Struktur und Charakteristika	2
2.1.2	Wirkungsspektrum	6
2.1.3	Wirkungsmechanismus und Wirkungstyp	8
2.1.4	Bedeutung für die Trockenzeitbehandlung beim Rind	11
2.2	BEURTEILUNG DER ANTIBAKTERIELLEN AKTIVITÄT DER BETALAKTAM-ANTIBIOTIKA IN VITRO	14
2.2.1	Wirkungsintensität	14
2.2.1.1	Minimale Hemmkonzentration (MHK)	14
2.2.1.2	Minimale bakterizide Konzentration (MBK)	16
2.2.1.3	Bakterizidie-Kinetik	20
2.2.2	Eiweißbindung	22
2.3	BESTIMMUNG DER WIRKUNGSINTENSITÄT VON ANTIBIOTIKA IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN	25
2.3.1	Milch und Mastitissekret vom Rind	25
2.3.2	Humanmedizinische Aspekte	27
2.4	ZUSAMMENSETZUNG DES TROCKENSEKRETS	28
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	31
3.1	MATERIAL	31

		Seite
3.1.1	Trockensekret	31
3.1.2	Milch und Mastitissekret	31
3.1.3	S.aureus - Teststämme	31
3.1.4	Antibiotika - Testsubstanzen	31
3.2	METHODIK	32
3.2.1	Gewinnung und Voruntersuchung der Eutersekretproben	32
3.2.2	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration	32
3.2.3	Bakterizidie - Kinetik	36
3.2.4	Vergleichende Prüfung des Abbaus von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium in Trockensekret und Testbouillon	36
3.2.5	Vergleichende Untersuchungen über den mikrobiologisch aktiven Anteil von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium in Trockensekret und Testbouillon	38
3.2.6	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	39
3.2.7	Penicillinasenachweis bei S.aureus	39
3.3	VERSUCHE UND VERSUCHSERGEBNISSE	40
3.3.1	MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Trockensekret und Testbouillon (DIN-Methode)	40
3.3.2	MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Milch, Mastitissekret und Testbouillon	42
3.3.3	Abbau des Antibiotikums in Trockensekret bzw. Testbouillon im Verlaufe der Bebrütung	42
3.3.4	Mikrobiologisch aktiver Anteil des Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon nach unterschiedlicher Vorbehandlung	43
3.3.5	Bakterizidie - Kinetik	45
3.3.6	MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Trockensekret und Testbouillon (Direkt-Methode)	46
3.3.7	Indirekte Bestimmung der MHK-Werte bei Trockensekreten durch Keimzählung	47

		Seite
4.	DISKUSSION	48
5.	ZUSAMMENFASSUNG	53
6.	SUMMARY	55
7.	LITERATURVERZEICHNIS	57

1. EINLEITUNG

Die antibiotische Versorgung des Rindereuters beim Trockenstellen gilt heute in Verbindung mit anderen Maßnahmen als ein wichtiges Verfahren zur Bekämpfung der Rindermastitis, insbesondere ihrer subklinischen Form. Zur Prophylaxe und Therapie in der Trockenzeit werden als antibakterielle Wirkstoffe die bakterizid wirkenden Betalaktam-Antibiotika umfangreich eingesetzt. Als wichtige Beurteilungsparameter der in vitro-Wirkungsintensität müssen die Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration und der minimalen bakteriziden Konzentration der Wirkstoffe angesehen werden. Diese Bestimmungen erfolgen im allgemeinen unter Verwendung von Testbouillon, einem auf Peptonbasis hergestellten künstlichen Nährmedium. Von beträchtlichem Interesse sind jedoch die Ergebnisse solcher Bestimmungen in den eiweißreichen Trockensekreten, zumal darüber im Schrifttum noch keine Informationen verfügbar sind.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, zu prüfen, ob und gegebenenfalls welche Unterschiede in den Ergebnissen der Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration von verschiedenen Betalaktam-Antibiotika gegenüber euterpathogenen S.aureus-Stämmen im Trockensekret vom Rind im Vergleich zur herkömmlichen Methode bestehen, wobei in erster Linie unmittelbar vor der Untersuchung entnommene Trockensekretproben und frisch isolierte euterpathogene S.aureus-Stämme geprüft werden sollten. Weiterhin war zu prüfen, ob die ermittelten minimalen bakteriziden Konzentrationen Rückschlüsse auf die minimalen Hemmkonzentrationen erlauben.

2. SCHRIFTTUM

2.1 BETALAKTAM-ANTIBIOTIKA

2.1.1 Chemische Struktur und Charakteristika

Die Gruppe der Betalaktam-Antibiotika umfasst die Penicilline und Cephalosporine. Alle Penicilline weisen als gemeinsamen Grundkörper ein kondensiertes ß-Laktam-Thiazolidin-Ringsystem, die 6-Aminopenicillansäure auf (FORTH et al., 1977). Ein Thiazolidinring ist an einen ß-Laktamring geknüpft, der eine freie Aminogruppe trägt (JAWETZ et al., 1977). Der Laktamring wird von ß-Alanin (ß-Aminopropionsäure) gebildet. ß-Alanin ist die einzige bisher in Naturstoffen gefundene ß-Aminosäure. Die 6-Aminopenicillansäure (6-APS) besitzt keine nennenswerte antibakterielle Wirkung.

Die verschiedenen Penicilline unterscheiden sich durch die Substitution an der 6ständigen Aminogruppe. Bei den Substituenten handelt es sich um organische Säuren, die meist aromatische Verbindungen darstellen, welche über eine Säureamidbindung mit der 6-APS verbunden sind. Beispielsweise ist Penicillin G Benzylpenicillin, Oxacillin 3-Phenyl-5-methyl-4-isoxazolylpenicillin.

Die Cephalosporine sind ähnlich den Penicillinen aufgebaut. Sie besitzen ebenfalls den ß-Laktamring, an den nicht wie bei den Penicillinen ein fünf-, sondern ein sechsgliedriger Heterozyklus, das Dihydrothiazin, ankondensiert ist. Das gemeinsame Grundgerüst der Cephalosporine ist somit die 7-Amino-Cephalosporansäure (7-ACS) (FORTH et al., 1977).

7-ACS hat selbst nur eine minimale bakterizide Wirksamkeit. Durch Verknüpfung der Aminogruppe mit verschiedenen Carbonsäuren und durch Veränderung der Substitution an C 3 erhält man halbsynthetische Cephalosporine mit guter antibakterieller Wirksamkeit. Cephacetril ist das 7-Cyan-acetamido-Derivat der 7-ACS.

Penicillin G als Säure ist in Wasser schlecht, in Form seiner Na- und K-Salze sehr gut löslich. Die Säure löst sich in organischen Lösungsmitteln gut (WALTER und HEILMEYER, 1975). Das Penicillin G-Molekül ist relativ unbeständig. Die Stabilität von Penicillin G bei 4°C beträgt in wässeriger Lösung maximal 120 Minuten, in organischen Lösungsmitteln maximal 70 Minuten. Die Alkalisalze weisen in trockenem Zustand eine gute Beständigkeit auf (MØLLER, 1966). Bei 24-25°C sind sie 5 Jahre haltbar (WALTER und HEILMEYER, 1975). Oxacillin ist gut wasserlöslich und in Lösung bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Oxacillin hat eine bessere Säurestabilität als Penicillin G (HOU und POOLE, 1971). Cephacetril ist bei pH-Werten ≥ 3 zu mehr als 10% wasserlöslich (MAURICE et al., 1973). Im pH-Bereich um 7,5 ist Cephacetril stabiler als bei höheren alkalischen pH-Werten (KRADOLFER et al., 1973).

Die antibakterielle Aktivität der Betalaktam-Antibiotika ist direkt mit dem ß-Laktam-Thiazolidin oder ß-Laktam-Dihydrothiazin-Ringsystem verknüpft; denn der Bruch an irgendeiner Stelle führt zum kompletten Aktivitätsverlust unabhängig von der Seitenkette (PRICE et al., 1967). Penicilline und Cephalosporine können von Bakterienenzymen, den ß-Laktamasen, den Amidasen und den Acetylesterasen angegriffen werden. Acetylesterasen sind von geringerem Interesse, weil sie ausschließlich die C 3-Acetylestergruppe der Cephalosporine angreifen. Die ß-Laktamasen von grampositiven Keimen scheinen induzierbar zu sein, während dies bei gramnegativen Erregern nicht der Fall ist.

Wenn der ß-Laktamring durch ß-Laktamasen enzymatisch gespalten wird, besitzt das resultierende Produkt, die Penicilloylsäure oder Cephalosporoylsäure, keine antibakterielle Aktivität mehr. Jedoch trägt die Penicilloylsäure eine Antigendeterminante der Penicilline und wirkt als sensibilisierendes Hapten, wenn sie an Serumproteine gebunden wird (JAWETZ et al., 1977).

Der Nachteil von Benzylpenicillin, seine Penicillinase-Empfindlichkeit, kann durch halbsynthetische penicillinasefeste Penicilline, etwa Oxacillin, ausgeglichen werden. Durch die Anwendung des Prinzips der sterischen Hinderung konnte der ß-Laktamring so geschützt werden, daß er für Penicillinase kaum noch angreifbar ist (FORTH et al., 1977). Dies wurde durch sperrige Seitenketten mit möglichst polarem Charakter erreicht. Oxacillin besitzt eine Methylphenyl-isoxazolyl-Seitenkette. Cephacetril ist gegenüber der Penicillinase aus S.aureus und gegenüber der ß-Laktamase aus E.coli (Stamm TEM) stabiler als etwa Cephaloridin und Cephalothin (KRADOLFER et al., 1973). Die Hydrolysegeschwindigkeit beträgt 0,26, verglichen mit der Geschwindigkeit der Hydrolyse von Penicillin G (= 100). Cephalonium ist ebenfalls gegenüber Penicillinase von S.aureus stabil (CURTIS et al., 1977).

Außer der Inaktivierung durch Bakterienenzyme kann das Antibiotikum auch vom Bakterium gebunden werden (BLUMBERG und STROMINGER, 1974). Die Menge an Penicillin, die von Bakterien gebunden wird, ist allerdings sehr klein. Es entsteht wahrscheinlich eine Bindung in Form eines Thioesters zwischen der Carbonylgruppe des ß-Laktamrings und einer meist noch nicht identifizierten Gruppe eines Bakteriums (PBC = Penicillin-binding-components). Die PBC's sind ihrer Natur nach Proteine, die entweder völlig oder größtenteils in der Zellmembran zu finden sind. Möglicherweise besitzen die Mikroorganismen mehrere PBC's. Grampositive Organismen binden 4-15 nmol Penicillin pro g Trockengewicht. E.coli bindet dagegen 5-10fach weniger (SUGINAKA et al., 1972).

Bei vorhandener Stabilität des entsprechenden ß-Laktamrings wird das Ausmaß der antibakteriellen Aktivität durch die Art der Seitenketten beeinflusst (PRICE, 1969). Alle Verbindungen mit großer antibakterieller Aktivität (Penicilline und Cephalosporine) besitzen eine fortlaufende Kette -C-CO-NH-C-CO-NH-C-COO-, beginnend in der

Seitenkette (-C-CO-NH-) und weiterführend entlang dem ß-Laktam- und Thiazolidin- oder Dihydrothiazin-Heterozyklus (HOU und POOLE, 1971).

Alle Betalakam-Antibiotika haben als Gruppeneigenschaft die langsame Resistenzentwicklung von primär empfindlichen Keimen, auch multple-step-mutation genannt (WALTER und HEILMEYER,1975). Es werden drei Arten der Resistenz unterschieden, die natürliche Spezies- oder Rassenresistenz, die primäre und sekundäre "erworbene" Resistenz sowie die infektiöse, übertragbare Resistenz (SCHLEGEL, 1972). Natürliche Rassenresistenz zeigen die meisten gramnegativen Keime beispielsweise gegenüber Penicillin G. Primär resistent sind Einzelorganismen aus einer Antibiotikumempfindlichen Kultur, die ohne vorherigen Antibiotikumkontakt verringerte oder fehlende Empfindlichkeit zeigen (SPONTANMUTATION). Sekundär resistent sind Keime aus einer empfindlichen Kultur, die während des Kontakts mit dem Antibiotikum eine verringerte oder fehlende Empfindlichkeit zeigen. Die primäre sowie die sekundäre "erworbene" Resistenz beruhen auf einer Mutation des Bakteriengenoms, wobei die Chemotherapeutika lediglich die Rolle von Selektionsmechanismen übernehmen (POLLOCK, 1960, GILLESSEN und GILLESSON, 1960). Die Häufigkeit eines bestimmten Mutantentyps in einer Bakterienkultur wird mit 10^{-5} bis 10^{-10} angegeben (FORTH et al., 1977). Solche Mutanten sind auf Grund der Zellgenveränderungen sehr stabil. Bei der sekundären "erworbenen" Resistenz wird zwischen one-step-mutation und multiple-step-mutation unterschieden. Bei der multiple-step-mutation erfolgt der Resistenzanstieg langsam durch mehrere Mutationsschritte. Die übertragbare, infektiöse Resistenz beruht auf einer Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle auf eine andere. Dabei handelt es sich um extrachromosomal gelagerte Gene (Resistenz-Faktoren, auch Plasmide oder Episome genannt), die Träger von Resistenzmerkmalen sind, die gegen Chemotherapeutika sowie eine Reihe weiterer Stoffe gerichtet sein können. Sie besitzen die Fähigkeit zur autonomen, vom

Chromosom der Zelle unabhängigen Replikation und können interbakteriell übertragen werden (FORTH et al., 1977). Diese Übertragung kann sowohl durch eine Transformation, Transduktion als auch durch eine Konjugation zustande kommen (SCHLEGEL, 1972).

Bei der Therapie mit Betalaktam-Antibiotika muß mit allergischen Nebenerscheinungen gerechnet werden. Bei etwa 2-3% der Patienten treten Penicillin G-Allergien auf. Hierbei sind vier Formen der Penicillin-Allergie bekannt: Allergisch-anaphylaktische Reaktionen, zytotoxische Reaktionen, Antigen-Antikörper-Komplex-Reaktion und verzögerte, zelluläre Reaktion (WALTER und HEILMEYER, 1975). Als Hauptdeterminante für Penicillin-Allergien gilt das Penicilloyl, als "minor determinants" gelten Penicillamin, Penicillinsäure, Penamaldehyd u.a. Die Isoxazolylpenicilline, etwa Oxacillin, zeigen bei Penicillin-sensibilisierten Patienten Parallelallergie zu allen anderen Penicillinen sowohl bei oraler als auch bei parenteraler Gabe (WALTER und HEILMEYER, 1975). Ebenso kann nach HERXHEIMER et al. (1975) für Penicillin-überempfindliche Patienten eine partielle Parallel-Allergenität (Kreuzresistenz) von Cephalosporinen gegenüber Penicillin bestehen. Dagegen weisen nach KRADOLFER et al. (1973) Präparate mit dem chemischen 7-ACS-Gerüst sehr oft keine gekreuzte Resistenz mit den Penicillinen auf. Nur etwa 10% aller Penicillin-Allergiker sollen auch gegen Cephalosporine überempfindlich sein. Es besteht jedoch bei den Cephalosporinen keine Kreuzresistenz gegenüber anderen Nicht-Betalaktam-Antibiotika (KRADOLFER et al., 1973).

2.1.2 Wirkungsspektrum

Der Wirkungsschwerpunkt von Penicillin G liegt hauptsächlich im grampositiven Bereich. Es ist zwar wirksam gegen einige gramnegative Erreger wie Gonokokken, Meningokokken (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1978), Pasteurella septica,

Bacteroides, Fusobacterium fusiforme, Streptobacillus und Bartonellen (FORTH et al., 1977), doch werden die meisten gramnegativen Keime nicht beherrscht, wie Escherichia coli, Proteus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonellen und Shigellen (JAWETZ et al., 1977, KUSCKINSKY und LÜLLMANN, 1978). Hervorzuheben ist die gute Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Kokken mit Ausnahme der Penicillinase-bildenden Stämme von S.aureus und der Streptokokken der serologischen Gruppe D (WALTER und HEILMEYER, 1975) sowie gegenüber Spirochäten (FORTH et al., 1977). Unter den Spirochäten weisen die Treponemen die größte Penicillinempfindlichkeit auf, während die Leptospiren meist nur bei Erkrankungsbeginn und auch dann nur in hohen Dosen zu beeinflussen sind (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1978). Bei den Borrelien konkurrieren die Tetracycline mit Penicillin G (FORTH et al., 1977). Unwirksam ist Penicillin G bei Viren, Pilzen, Protozoen sowie bei Rickettsien und Mykoplasmen.

Die antibakterielle Wirksamkeit der Isoxazolyl-Penicilline ist auf grampositive Keime beschränkt, wobei Enterokokken nicht in das therapeutische Wirkungsspektrum fallen (WALTER und HEILMEYER, 1975). Der Vorzug der penicillinasefesten Penicilline, wie Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin, liegt in ihrer Aktivität gegenüber Penicillinase-bildenden Staphylokokken. Die Wirkungsintensität ist um das 250fache (WALTER und HEILMEYER, 1975) bzw. um das 50 bis 400fache (FORTH et al., 1977) höher als die von Penicillin G gegenüber Penicillinase-positiven Staphylokokken. Eine Wirkungseinbuße ist gegenüber Penicillinase-negativen Staphylokokken vorhanden, die bei einer Größenordnung von 90% liegt. Obwohl die Isoxazolyl-Penicilline Penicillinase-stabil sind, besitzen sie die Fähigkeit, die Bildung von Penicillinase in Bakterien zu induzieren (FORTH et al., 1977), so daß deren unkritische Anwendung zu einer Vermehrung hochresistenter Penicillinase-bildender Staphylokokken führen kann. Diese Enzyminduktion ist im Gegensatz zu einer Genmutation nicht so stabil (POLLOCK, 1960). POLLOCK (1958) stellte fest, daß die durch

Penicillin induzierte Penicillinasebildung von B.cereus auf einem stabilen Enzymsystem (EFS = enzyme-forming-system) beruht, das ohne Anwesenheit von Penicillin bis zu zehn Zellgenerationen weitergegeben wird.

Die Cephalosporine besitzen ein Wirkungsspektrum ähnlich dem des Ampicillins, wobei außerdem die meisten Klebsiellen und Penicillinase-positiven Staphylokokken erfaßt werden (HERXHEIMER et al., 1975). Dagegen sind nach KRADOLFER et al.(1973) und HERXHEIMER et al. (1975) Stämme von Pseudomonas aeruginosa, indolpositive Proteusarten, Enterobacter und Serratia gegenüber Cephalosporinen resistent. Bei einer Konzentration von 15 mcg/ml Cephacetril sind alle untersuchten Stämme von Diplococcus pneumoniae, Streptokokken sowie Neisseria meningitidis empfindlich. Dagegen sind gegenüber 15 mcg/ml Cephacetril über 90% der Penicillinase-negativen Staphylokokken, etwa 78% der Enterokokken, etwa 68% der Klebsiellen, 65% von Proteus mirabilis, etwa 62% von Escherichia coli und Shigella und 50% von Haemophilus influenzae sensibel (KRADOLFER et al.,1973). Cephalonium besitzt ebenfalls eine gute Wirksamkeit im grampositiven wie im gramnegativen Bereich, wobei im Vergleich zu anderen Cephalosporinen eine hervorragende Aktivität im gramnegativen Bereich besteht (SPENCER et al., 1966). Penicillin-resistente und Penicillin-sensible Stämme von S.aureus sind gleichermaßen empfindlich gegenüber Cephalonium. 50 Cephalonium-sensible gramnegative Stämme hatten bei einer Untersuchung von CURTIS et al. (1977) eine minimale Hemmkonzentration von 1,6 bis 25 mcg/ml Cephalonium. 21 von 30 untersuchten E.coli Stämmen waren bei einer minimalen Hemmkonzentration von 3,1 mcg/ml gegenüber Cephalonium sensibel.

2.1.3 Wirkungsmechanismus und Wirkungstyp

Bei den Bakterien werden Zytoplasma und Membran von einer starken Zellwand umschlossen, deren Grundgerüst aus Murein besteht.Bei den gramnegativen Bakterien ist das Mureinnetz einschichtig und die Wanddicke beträgt 6-10 nm. Bei

den grampositiven Bakterien ist das Mureinnetz mehrschichtig und enthält häufig Lysin. Die Wanddicke beträgt 15-35 nm (WIESMANN, 1974). Eine Zerstörung der Zellwand(z.B. durch Lysozym) oder die Hemmung ihrer Bildung kann zur Lyse der Zelle führen (JAWETZ et al., 1977). Der Wirkungsmechanismus der Betalaktam-Antibiotika beruht auf einer Hemmung der Zellwandbiosynthese (STROMINGER und TIPPER, 1965).

Das Murein (Peptidoglycan) besteht aus zwei Aminozuckern (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure), wobei die letztere nur in Bakterien gefunden wird, und aus mehrere Aminosäuren. Bei der Synthese des Mureins wird zunächst durch Aneinanderreihung von niedermolekularen Baustoffen in der Bakterienzelle ein lineares Polymer gebildet, das im letzten Schritt im periplasmatischen Raum vernetzt wird, wodurch das Murein seine Festigkeit und Starrheit erhält (FORTH et al., 1977). Diese Mureinvernetzung wird durch Betalaktam-Antibiotika verhindert, die in die letzte Phase der Mureinsynthese eingreifen.

Die Mureinsynthese vollzieht sich in drei Schritten (BLUMBERG und STROMINGER, 1974). Im Zytoplasma wird zunächst UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid gebildet, wonach es innerhalb der Zytoplasmamembran zur Bildung des linearen Polysaccharidpolymers kommt. Der letzte Schritt läuft an der Außenseite der Zytoplasmamembran ab. Die linearen Glycopeptidstränge werden durch Quervernetzungen (cross-linking) miteinander verknüpft. Diese enzymatische Transpeptidierungsreaktion erfolgt zwischen der endständigen Aminogruppe der Pentaglycinkette (NH-D-Ala-COOH) und dem terminalen Di-Alaninpeptid (NH_2) eines zweiten Glycopeptidstrangs, wobei ein D-Alanin (D-Ala) freigesetzt wird (FORTH et al., 1977). Die Betalaktam-Antibiotika reagieren mit dieser Murein-Transpeptidase, die die Quervernetzung katalysiert. Unter Aufspaltung des Betalaktamrings entsteht ein Penicilloyl-Enzym-Komplex, so daß die Transpeptidase irreversibel inaktiviert wird

(BLUMBERG und STROMINGER, 1974). Wahrscheinlich beruht die Hemmung der Transpeptidase auf einer strukturellen Ähnlichkeit der Betalaktam-Antibiotika mit dem Dipeptid D-Alanyl-D-Alanin (JAWETZ et al., 1977). Die C-N-Bindung des ß-Laktamrings entspricht dem terminalen D-Alanyl-D-Alanin der Pentapeptidkette, dem Substrat der Transpeptidase. Die unterschiedliche Empfindlichkeit grampositiver und gramnegativer Keime gegenüber den Betalaktam-Antibiotika hängt wahrscheinlich von strukturellen Unterschieden in deren Zellwand ab (z.B. Menge des Peptidoglycans, Anwesenheit von Lipiden, Art der Querverknüpfung, Aktivität autolytischer Enzyme), die somit Penetration, Bindung und Aktivität der Antibiotika bestimmen (JAWETZ et al., 1977). Den Säugetierzellen fehlt jegliche Toxizität durch Betalaktam-Antibiotika infolge der Abwesenheit einer bakteriellen Zellwand, insbesondere dem Peptidoglycan. Da der Wirkungsmechanismus der Betalaktam-Antibiotika auf der Hemmung der Transpeptidierungsreaktion beruht, können die Betalaktam-Antibiotika ihre volle Wirkung nur bei proliferierenden Keimen entfalten. Der Aufbau der Zellwand wird gehemmt und führt zur Bildung großer elongierter, fadenförmiger, bizarrer Formen. Das Absterben ist ein sekundärer Vorgang, bei dem die Zelle, gefördert durch lytische Enzyme in der Zellwand, lysiert. Somit gehören die Betalaktam-Antibiotika zu den bakteriziden Antibiotika. Man unterscheidet bei der Wirkung eines antimikrobiell wirksamen Stoffes zwischen Bakteriostase und Bakterizidie. Bei der Bakteriostase wird die Bakterienvermehrung gehemmt, die Vermehrung kommt jedoch wieder in Gang, sobald der antimikrobiell wirksame Stoff entfernt wird. Die bakterizide Wirkung unterscheidet sich von der bakteriostatischen darin, daß sie irreversibel ist, das heißt, das Bakterium kann sich auch dann nicht mehr vermehren, wenn es nicht meht unter der Antibiotikumwirkung steht. Hierbei wird zwischen einem absolut bakteriziden und einem degenerativen Wirkungstyp unterschieden (WALTER und HEILMEYER, 1975). Beim absolut-bakteriziden Wirkungstyp setzt die Wirkung sofort nach der Zugabe des antimikrobiell wirksamen Stoffes ein, unabhängig davon, ob sich die be-

treffende Erregerpopulation in einer Vermehrungs- oder Ruhephase befindet (FORTH et al., 1977). Charakteristisch ist dieser Wirkungstyp für Desinfektionsmittel , während er bei Chemotherapeutika nur selten beobachtet wird. Ein Beispiel hierfür sind die Polymyxine. Bei dem degenerativ-bakteriziden Wirkungstyp besteht eine unterschiedlich lange lag-Phase bis zum Wirkungseintritt (lag-Phase von Penicillin G 20-30-60 Minuten). Außerdem ist die Wirkung auf proliferierende Keime beschränkt. Trotz der bakteriziden Wirkung der Betalaktam-Antibiotika werden nicht alle Keime abgetötet, da sich nicht alle in einem synchronen Stoffwechselzustand befinden. Es überleben einige Keime, sogenannte Persister. Die Zahl solcher Persister wird auf etwa $1:10^6$ bis $1:10^8$ geschätzt (WALTER und HEILMEYER, 1975). Zur Persistenz neigen Staphylokokken, Streptokokken, Tuberkelbakterien, Enterobakterien und Bruzellen. Diese Persistenz tritt besonders bei intrazellulär gelagerten Keimen auf. Während extrazelluläre Staphylokokken zu mehr als 99,99% durch Penicillin G eliminiert werden, liegt die Eliminationsrate bei intrazellulär gelagerten Staphylokokken nur bei 90-95%. Diese Persister sind durch ihre Stoffwechsellage penicillinunempfindlich, aber nicht penicillinresistent. Zur erneuten Vermehrung benötigen Persister eine Erholungszeit von 2-3 (bei Staphylokokken) bzw. 5-7 Stunden (bei Pneumokokken).

2.1.4 Bedeutung für die Trockenzeitbehandlung beim Rind

Die Therapie zu Beginn des Trockenstellens spielt eine große Rolle in der Kontrolle der subklinischen Rindermastitis. Die Behandlung zielt darauf ab, subklinische Infektionen am Ende der Laktation zu eliminieren und das Euter vor Neuinfektionen während der Trockenperiode zu schützen (PUGH et al., 1973). Um die Erfolge noch zu verbessern, sollte die Behandlung auch auf nicht erkrankte Tiere ausgedehnt werden (JACOBS et al., 1972). Nicht ohne Einfluß auf die Neuinfektionsrate scheint die Art des Trockenstellens zu sein. Nach NATZKE et al.(1975) ist

das intermittierende Trockenstellen vorteilhafter als das abrupte.

Die meisten Neuinfektionen (etwa 82%) entstehen innerhalb der ersten drei Wochen nach dem Trockenstellen, der Rest fällt in die Phase bis zur Geburt (NEUMEISTER et al., 1975). Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien sowie coliforme Keime sind die häufigsten euterpathogenen Keime in der Trockenzeit (CURTIS et al., 1977).

Als Trockenzeitpräparate eignen sich alle Formulierungen, die gegen die wichtigsten während der Trockenperiode vorkommenden Erreger antibakteriell wirksam sind und über eine möglichst lange Verweildauer des Wirkstoffs im Euter verfügen (JACOBS et al., 1972). Von den meisten Autoren wird eine Mindestverweildauer des Wirkstoffs von drei Wochen gefordert (SMITH et al., 1966, JAKOBS et al., 1972 und NEUMEISTER et al., 1975).

Der Antibiotikum-Trockensekretspiegel wird hauptsächlich durch das Ausmaß der Wirkstoffresorption durch das Euter beeinflußt (ZIV et al., 1973 a). Hierbei spielen physikochemische Eigenschaften des Arzneimittels, insbesondere das Ausmaß der Lipidlöslichkeit und die Dissoziation, eine große Rolle (ZIV et al., 1973 a), da sich das Euterepithel wie eine Lipidbarriere verhält, deren Poren nur von wasserlöslichen, niedermolekularen Komponenten, wie Harnstoff, durchdrungen werden können, während die wasserlösliche ionisierte Fraktion des Arzneimittels mit Molekulargewichten über 200 die Lipidbarriere nicht durchdringen kann (RASMUSSEN, 1971). Dagegen kann die nicht ionisierte Fraktion des Arzneimittels die Lipidbarriere überwinden.

Als weiteres Charakteristikum für Trockenzeitpräparate wird eine möglichst geringe Reizung des Eutergewebes gefordert (JACOBS et al., 1972).

Um eine möglichst lange Einwirkungsdauer der Medikamente zu erreichen, verwendeten WALSER et al. (1973) Depotpräparate, insbesondere Benzathinsalze verschiedener Penicilline. Durch die Verwendung öliger Suspensionen und durch Zusatz von Aluminiummonostearat wurde die therapeutische Wirkungsdauer noch verlängert. Bei Verwendung von Cloxacillin- bzw. Penicillin-Chloramphenicol wurden 73,3% bzw. 72,3% aller subklinischen Mastitiden bis zum Zeitpunkt des Abkalbens eliminiert. Bei der Behandlung speziell von S.aureus-Infektionen wurden mit Cloxacillin 70,3% und mit Penicillin-Chloramphenicol jedoch nur 57,7% der subklinischen Mastitiden geheilt. Nach PUGH et al. (1973) wurden mit 1g Procain-Penicillin und 0,5 g Dihydrostreptomycin pro Euterviertel 80% aller S.aureus-Infektionen und 97% aller Streptokokken-Infektionen des Euters eliminiert. Auch ROSSELET et al. (1977) erzielten gute Ergebnisse mit der Kombination Benzylpenicillin und Dihydrostreptomycin in Hinblick auf durch Staphylokokken verursachte Mastitiden während der Trockenperiode. KINGWILL et al. (1970) konnten durch die Verabreichung von 0,5 bzw. 1g Benzathin-Cloxacillin beim Trockenstellen innerhalb von zwei Jahren die Infektionshäufigkeit der Euterviertel von 28% auf 9% senken. Die durchschnittliche Zellzahl der Sammelmilchproben fiel von 730.000 Zellen/ml auf 400.000. PEARSON und WRIGHT (1969) konnten mit 200 mg Na-Cloxacillin 60% der S.aureus-Infektionen eliminieren, mit 300 mg Procain-Penicillin G nur 38%.

SMITH et al. (1967) berichteten über Heilungsraten von 84% (S.aureus) und 95% (Streptokokken) nach Anwendung von 1g Benzathin-Cloxacillin. CURTIS et al. (1977) verwendeten das Cephalosporin Cephalonium in öliger Suspension als Langzeitformulierung (250 mg/Euterviertel). 81% der infizierten Euterviertel wurden mit Erfolg behandelt, wobei S.aureus, Streptokokken und E.coli als Infektionserreger ermittelt worden waren. Noch nach zehn Wochen nach dem Trockenstellen waren die durchschnittlichen Cephalonium-Trockensekretspiegel in 22 von 24 Proben höher als die minimalen Hemmkonzentrationen für S.aureus, Strepto-

kokken und Corynebakterien mit Ausnahme von E.coli (HARRIS et al., 1976). Sc. agalactiae und Sc. dysgalactiae wurden zu 100% eliminiert, Sc. uberis zu 90%. Alle Erreger waren gegenüber 0,1 mcg/ml Cephalonium sensibel. S.aureus wurde nur zu 60% eliminiert. 250 mg Cephoxazol und 250.000 IE Procain-Penicillin pro Euterviertel wurden von HARRIS et al.(1976) mit gutem Erfolg verwendet, um subklinische Mastitiden in der Trockenperiode anzugehen.

PEARSON und WRIGHT (1969), KINGWILL et al. (1970) und WALSER et al. (1973) sind jedoch der Ansicht, daß ein dauerhafter Erfolg nur zu erwarten ist, wenn die Therapie mit laufenden hygienischen Maßnahmen und melktechnischer Überwachung einhergeht.

2.2 BEURTEILUNG DER ANTIBAKTERIELLEN AKTIVITÄT DER BETALAKTAM-ANTIBIOTIKA IN VITRO

2.2.1 Wirkungsintensität

2.2.1.1 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Die genaue Kenntnis der Wirkungsweise von Antibiotika bzw. Chemotherapeutika auf Mikroorganismen ist von großer Bedeutung für den sinnvollen Einsatz dieser Wirkstoffe in der Praxis, für die Auswahl neuer Wirkstoffe und für epidemiologische Studien. Ein wichtiger Beurteilungsparameter der antibakteriellen Wirkung eines Chemotherapeutikums ist die Wirkungsintensität, meist ausgedrückt als MHK-Wert in mcg/ml Substrat. Dieser Wert ist jedoch nicht absolut, sondern wird vielmehr durch die Versuchsbedingungen beeinflußt. Beispielsweise können Unterschiede in der Keimeinsaat, Medienzusammensetzung, pH-Wert und Inkubationszeit die Höhe der Antibiotikakonzentration beeinflussen, die gerade nötig ist, um einen Mikroorganismus im Wachstum zu hemmen (ERICSSON und SHERRIS, 1971; GREENWOOD, 1976). Deshalb sollte die minimale Hemmkonzentration (MHK,

engl. MIC = minimal inhibitory concentration) eines Antibiotikums gegenüber einem Mikroorganismus im Hinblick auf die Testbedingungen definiert werden (ERICSSON und SHERRIS, 1971).

So wird die MHK als die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (in mcg/ml bzw. E/ml) definiert, bei der die Vermehrung eines Keimes unter definierten Bedingungen verhindert wird (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1973).

Zur Bestimmung der MHK kann die Bouillonverdünnungsmethode oder die Agarverdünnungsmethode verwendet werden. Standardisierungsvorschläge stammen von der WELTGESUNDHEITSORGANISATION (1961) und vom FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN (1976).

GARROD und WATERWORTH (1969) sowie WATERWORTH (1978) gaben zu bedenken, daß die Untersuchungen zur Bestimmung der Wirkungsintensität stark von dem betreffenden Testmedium beeinflusst werden können und forderten deshalb Richtlinien, um die mit verschiedenen Medien in den verschiedenen Ländern erhaltenen MHK-Ergebnisse vergleichen zu können. Als geeignetes Medium für die beiden Verdünnungsmethoden wurde sowohl von BARRY und SABATH (1974) als auch vom FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN (1976) das Mueller-Hinton-Medium vorgeschlagen.

Wie von GREEWOOD (1976) erwähnt, wird die MHK-Bestimmung auch durch die Keimeinsaat beeinflusst.

Mit Hilfe der MHK ist eine Möglichkeit für die Beurteilung der Erregerempfindlichkeit gegeben. Um die Erregerempfindlichkeit festzulegen, sollte der Wirkstoffspiegel am Ort der gewünschten Wirkung hinzugezogen werden. Da jedoch dieser Wirkstoffspiegel am betreffenden Wirkungsort nicht immer feststellbar ist, wird in der Humanmedizin vorläufig die Wirkstoffkonzentration im Serum (Ausnahme: Nitrofurantoin im Urin) als Anhaltspunkt für

den Wirkstoffspiegel am Ort der gewünschten Wirkung verwendet (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976). Festgelegt wird dabei der mittlere Serumspiegel in der Mitte des Applikationsintervalls (3 h Wert bei 6stündiger, 4 h Wert bei 8stündiger Applikation). Empfindlichkeit eines Erregers liegt vor, wenn seine MHK niedriger ist als der unter therapeutischen Bedingungen bei üblicher Dosierung in vivo erreichbare mittlere Serumspiegel. Der Erreger besitzt mäßige Empfindlichkeit, wenn die MHK niedriger als der mittlere Serumspiegel bei hoher Dosierung ist. Es wird von Unempfindlichkeit gesprochen, wenn die MHK größer ist als der mittlere Serumspiegel (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976).

Obwohl die MHK ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung antibakterieller Substanzen ist, wird ihre Bedeutung vielfach überschätzt. Es hat deshalb immer wieder Autoren gegeben, die vor einer Überbewertung der MHK warnen (GREENWOOD, 1976). Die MHK schwankt aufgrund der Verfügbarkeit an aktivem Wirkstoff, der Keimdichte des Inokulums, der Inkubationsdauer und dem verwendeten Medium (SELWYN, 1976). Mit ihrer Standardeinsaat von 10^5 - 10^6 Keimen/ml kann die MHK den wechselnden klinischen Situationen nur bedingt gerecht werden, da in vivo oft dichtere Keimpopulationen auftreten (BREUER und STARKE, 1976). Außerdem macht die MHK keine Aussagen über die ersten Stunden der Einwirkung des Antibiotikums auf die Bakterienkultur. Nach BREUER und STARKE (1976) sollten Wachstumskurven, über einen Zeitraum von 24 Stunden erstellt, die MHK ergänzen.

2.2.1.2 Minimale bakterizide Konzentration (MBK)

Eine Reihe von Wirkstoffen kann, in höheren Konzentrationen als die MHK angewendet, eine irreversible Wachstumshemmung (Bakterizidie) verursachen (BARRY und SABATH, 1974). Man bezeichnet die minimale bakterizide Konzentration (MBK, engl. MBC = minimal bactericidal concentration) als die niedrigste Konzentration eines Wirk-

stoffes (in mcg/ml bzw. E/ml), die notwendig ist, um einen Keim unter definierten Bedingungen abzutöten (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976). Nach BARRY und SABATH (1974) wird der Begriff "minimal lethal concentration (MLC)" mit der MBK gleichgesetzt. Die MLC ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, welche unter definierten Bedingungen nach Bebrütung innerhalb einer festgelegten Zeitspanne eine minimale Anzahl von Keimen überleben läßt. Es ist die Wirkstoffkonzentration, die nach 18stündiger Bebrütung der Bouillonverdünnungsreihe eine 99,9% Keimabtötung bewirkt, das heißt, daß nur 0,1% der vermehrungsfähigen Keime des Primärinokulums überleben und unter Testbedingungen wachsen können (BARRY und SABATH, 1974). Geht man beispielsweise von einer Keimzahl von 10^5 vermehrungsfähigen Keimen pro ml aus, so darf die Überlebensrate nicht mehr als 100 Keime pro ml betragen.

Für die Bestimmung der MBK gibt es bis heute, im Gegensatz zur MHK-Bestimmung (WELTGESUNDHEITSORGANISATION, 1961; FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976), noch keine standardisierte Versuchsanordnung. Die Grundlage der MBK-Bestimmung stellt normalerweise die Bouillonverdünnungs- oder die Agarverdünnungsmethode dar; die Ausweitung dieser Versuchsgrundlage zur Bestimmung der MBK wird jedoch unterschiedlich gehandhabt.

Grundsätzlich kann nach dem Versuchsaufbau zwischen zwei Arten der MBK-Bestimmung unterschieden werden. Die eine Methode besteht in einer Verfeinerung der MHK-Bestimmung, wobei zur Bestimmung der MBK ebenfalls die Trübung der Verdünnungsreihe als diagnostisches Merkmal herangezogen wird. Bei der anderen Versuchsmethode wird die Verdünnungsreihe außer der Prüfung auf Trübung (soweit dies aufgrund des Untersuchungsmaterials überhaupt möglich ist) außerdem einer genaueren Untersuchung in Form eines Ausstriches auf Agarplatten unterzogen.

Nach der erstgenannten Methode bestimmten PRICE et al.(1955 /1956) sowie WICK und BONIECE (1965) die MBK des jeweiligen Antibiotikums. PRICE et al. (1956) überführten jeweils 0,01 ml von jedem Röhrchen der Bouillonverdünnungsreihe in eine neue zweite Verdünnungreihe. Nach 18 bis 20stündiger Bebrütung wurden diese Röhrchen auf Trübung geprüft. Als MLC wurde die entsprechende Wirkstoffkonzentration des ersten unbewachsenen Röhrchens angesehen. Auch WICK und BONIECE (1965) beurteilten die bakterizide Aktivität, indem sie mit einer Öse Material aus verschiedenen Verdünnungsröhrchen in frische antibiotikafreie Bouillon überführten und während der nachfolgenden Bebrütung die Röhrchen auf Trübung untersuchten.

Die meisten MBK-Bestimmungen wurden jedoch mit der zweiten Versuchsmethode durchgeführt, wobei die Beurteilung des Ausstriches entweder in einer Schätzung oder in einer genauen Zählung des Kolonienwachstums bestand.

MÖSSNER et al. (1969) versuchten die Bakterizidie in % auszudrücken. Mit einer genormten Öse wurde Material aus dem den MHK-Wert darstellenden Röhrchen und aus weiteren negativ gebliebenen Röhrchen der Verdünnungsreihe sowie aus dem getrübten Kontrollröhrchen (ohne Wirkstoff) auf gleichgroße Sektoren von Blutagarplatten ausgestrichen. Die prozentuale Abschätzung der Bakterizidie erfolgte nach 24stündiger Bebrütung anhand der Intensität des Koloniewachstums des Kontrollsektors als "Standard". Kein Wachstum auf dem Agarplattensektor entsprach einer 100%igen Bakterizidie.

DREWS (1968) entnahm aus den Röhrchen der Verdünnungsreihe, die nach 24 Stunden keine Trübung zeigten und dem Röhrchen mit der geringsten Wirkstoffkonzentration, die gerade noch ein Wachstum zuließ, jeweils eine Probe. Von diesen Proben wurden jeweils 0,05 ml unverdünnt und 1:5 verdünnt auf Agarplatten ausgespatelt. Ein bakterizider

Effekt lag vor, wenn die Ausgangskeimzahl nach 24 Stunden deutlich abgenommen hatte.

BARRY und SABATH (1974) gaben genauere Richtlinien zur MBK-Bestimmung. Anhand der Bouillonverdünnungsmethode wurde zunächst der MHK-Wert abgelesen. Dann wurden 0,1 ml von dem Röhrchen, das die MHK darstellte, und den übrigen keine Trübung zeigenden Röhrchen auf Blutagarplatten übertragen und ausgespatelt. Ein bakterizider Effekt lag vor, wenn nach 18 - 24stündiger Bebrütung nicht mehr als 10 Kolonien gezählt werden konnten.

Auch ZIV et al. (1973 b) gingen bei der Bestimmung der Bakterizidie zunächst vom Reihenverdünnungstest aus. Es wurden jeweils 0,01 ml mit einer normierten Öse aus den Trübung zeigenden Röhrchen und aus dem letzten klar gebliebenen Röhrchen der Verdünnungsreihe entnommen und auf Blutagarplatten ausgestrichen. Das Wachstum von weniger als 4 Kolonien nach Übernachtbebrütung bei 37°C zeigte die MBK an.

Noch strengere Maßstäbe in Bezug auf die Festlegung des bakteriziden Effekts legen die folgenden Autoren an. APPLESTEIN et al. (1968) übertrugen jeweils 0,005 ml mit einer normierten Öse auf Blutagarplatten. Ein bakterizider Effekt lag vor, wenn nach Übernachtbebrütung kein Koloniewachstum sichtbar war. SHAHIDI und MARSHALL (1967), SHAHIDI und MARSHALL (1968) und KHAN und MARSHALL (1969) verwendeten Ösen mit 0,01 ml Fassungsvermögen zur Übertragung auf Agarplatten. Auch hier wurde als MBK die niedrigste Wirkstoffkonzentration verstanden, bei der sich keine Kolonie auf der Blutagarplatte entwickeln konnte. HARWICK et al. (1968), KLASTERKY et al. (1974) und SCHEER (1976) bezeichneten ebenfalls als MBK die niedrigste Wirkstoffkonzentration, die kein Koloniewachstum auf dem Agar zuließ.

RUSSEL (1978) gab zu bedenken, daß bei der MBK-Bestimmung möglicherweise hemmende Konzentrationen des Antibiotikums

mit überlebenden Keimen gemeinsam auf den Agar übertragen werden könnten. Um dies zu vermeiden, sollte ein inaktivierender Wirkstoff mitverwendet werden, wie ß-Laktamase zur Inaktivierung der Betalaktam-Antibiotika, Thymidin zur Aufhebung der Trimethoprim-Aktivität oder p-Aminobenzoesäure zur Ausschaltung von Sulfonamiden.

2.2.1.3 Bakterizidie-Kinetik

Neben MHK- und MBK-Bestimmung können Untersuchungen zur Kinetik der Bakterizidie wesentliche Erkenntnisse über die antibakterielle Aktivität eines Antibiotikums vermitteln (HELM, 1977). Anhand von Abtötungskurven ("killing curves") kann die Auseinandersetzung zwischen Antibiotikum und Mikroorganismus genauer verfolgt werden (BREUER und STARKE, 1976), wobei die Wirkung einer Substanz in dem für die Behandlung wichtigen Zeitraum (bis zu 8 Stunden) geprüft werden kann. Als Definition des Absterbevorgangs gilt der irreversible Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion (Wachstum und Teilung). Der Nachweis der Abtötung wird durch Kultivierung auf festen Nährmedien geführt. Ein Bakterium ist abgetötet, wenn es auf keinem Nährmedium die Koloniebildung in Gang setzt (JAWETZ et al.,1977). Deshalb erscheint es wichtig, bei Untersuchungen über die Bakterizidie-Kinetik das verwendete Nährmedium anzugeben, da die verschiedenen Nährmedien auch die Überlebensrate beeinflussen können. HELM (1977) wählte Körperflüssigkeiten (Plasmawasser, Galle, Fruchtwasser und Urin) als Testsubstrate, um auch den Verhältnissen im Körper Rechnung zu tragen. KIRBY et al.(1962) und BREUER und STARKE (1976) führten ihre Untersuchungen mit TSB-Medium durch, wobei die Zählung der Kolonien nach 2, 4, 8 und 24stündiger Bebrütung erfolgte. BREUER und STARKE (1976) führten Trübungsmessungen im Biophotometer durch. HELM (1977) wendete die Membranfiltermethode an. Die Zahl der überlebenden Keime wurde nach 1, 2, 4 und 8stündiger Bebrütung bestimmt. Das Inokulum betrug 10^5

(HELM, 1977) bzw. 10^7 vermehrungsfähige Keime/ml (KIRBY et al., 1962, BREUER und STARKE, 1976). KIRBY et al. (1962) verwendeten für die Abtötungskurven von Oxacillin und Methicillin gegenüber Penicillinase-bildenden Staphylokokken höhere Konzentrationen als den MHK-Werten entsprach. Die gewählten Abtötungskonzentrationen betrugen 2 bzw. 4 mcg/ml für Oxacillin (MHK 0,8 mcg/ml) und 5 bzw. 10 mcg/ml für Methicillin (MHK 3,8 mcg/ml). Die Konzentrationen von Cephazolin, Cephacetril, Cephalexin und Cephradin gegenüber ß-Laktamase-produzierenden Staphylokokken betrugen ein Zehnfaches ihrer MHK-Werte (BREUER und STARKE, 1976), nämlich 7 mcg/ml für Cephazolin, 11 mcg/ml für Cephacetril, 40 mcg/ml für Cephalexin und 40 mcg/ml für Cephradin. Als Maß für die Bakterizidie galt der Abfall der logarithmisch aufgeführten Ausgangskeimzahl. HELM (1977) verwendete als Maß für die bakterizide Wirkung eines Antibiotikums die Angabe der Zeit (T 99), in der eine 99%-Abtötung der Ausgangskeimzahl erreicht wurde. T 99 ist um so kürzer, je stärker der bakterizide Effekt eines Antibiotikums ist. Nach BARRY und SABATH (1974) ist es sinnvoll, die Abtötungskurven mit Antibiotika-Konzentrationen durchzuführen, die den während der Therapie durchschnittlichen Blutspiegeln entsprechen. Als entsprechendes Medium wurde Mueller-Hinton-Bouillon vorgeschlagen. Die Keimeinsaat betrug 10^5 Keime/ml. Die Bebrütung erfolgte bei $37^{\circ}C$. Die Zahl der überlebenden Keime wurde zu Versuchsbeginn, nach 4 und 24 Stunden bestimmt, gelegentlich auch nach 48 und 72 Stunden. Die überlebenden Zellen wurden logarithmisch gegen die Zeit der Bebrütung aufgetragen. Ein schneller Abfall der Keimzahl kann dabei von einem starken Keimzahlanstieg gefolgt sein (Selektion resistenter Keime oder teilweise Inaktivierung des Antibiotikums). Da bestimmte Antibiotika an Serumproteine stark gebunden sein können, kann durch Zugabe von 50% Serum zur Testbouillon oder durch die Bakterizidie-Bestimmung in Serum der in vivo-Situation nähergekommen werden. Da das Serum sehr unterschiedlich sein kann, sollten nur gepoolte Seren verschiedener gesunder Individuen verwendet werden (BARRY und SABATH, 1974).

Parallel zu den Abtötungskurven müssen Kontrollen erstellt werden, um so die Vermehrungsfähigkeit der Keime ohne Wirkstoffzusatz darzustellen (BREUER und STARKE, 1976; HELM, 1977). Dabei steigt die Zahl der Zellen exponentiell an, da jede der beiden Tochterzellen, die durch Wachstum und Teilung einer einzelnen Zelle entstehen, wieder in der Lage ist, sich mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Elternzelle zu vermehren (JAWETZ et al., 1977).

2.2.2 Eiweißbindung

Ein weiterer Parameter für die Wirkungsintensität eines Chemotherapeutikums ist dessen Affinität zu Proteinen (Eiweißbindung). Albumin ist aufgrund seiner Vielfältigkeit, Substanzen zu binden, das meistbekannte bindende Protein. Metaboliten, die an Albumin gebunden werden können, schließen auch so verschiedene Substanzen wie Fettsäuren, Bilirubin, Kalium oder Hormone ein. Die Bindung an Albumin muß als dynamischer Prozess angesehen werden, in dem ein konstantes Verhältnis zwischen gebundenem und freiem Wirkstoff besteht (KUNIN, 1967). Es entsteht ein Wirkstoff-Albumin-Komplex. Die Beseitigung von freiem Wirkstoff durch Niere, Leber und Gewebe bewirkt eine Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Komplex. Die Proteinkomplexe tendieren nach KUNIN (1967) dazu, im intramuskulären Raum entsprechend der Verteilung des Proteins zurückgehalten zu werden. Die glomeruläre Filtration ist meist völlig auf den ungebundenen Anteil beschränkt, während die aktive Tubulärfiltration sogar stark gebundene Wirkstoffe schnell filtriert.

KUNIN (1961) untersuchte mit Hilfe der Dialysemethode vier Penicilline auf ihre Proteinbindung im menschlichen Serum. Der gebundene Anteil von Penicillin G betrug 48,7%, von Penicillin V 74,4%, von Phenethicillin 78% und von Phenylmercaptomethylpenicillin 78%. Nach ZIV und SULMAN (1972) bestanden nur geringe Unterschiede in der Eiweißbindung verschiedener tierischer Serumproteine, etwa vom Schaf und Rind, bei 37 untersuchten anti-

bakteriellen Wirkstoffen (Penicillin, Tetracyclin, Aminoglykoside, Polypeptide und andere Antibiotika), und die Ergebnisse waren denen in Humanserum erzielten ähnlich. Auch WOZNIAK (1960) stellte keine Unterschiede in der Eiweißbindung von Tetracyclinen in Hunde- oder Humanplasma fest. Die Sulfonamide wurden dagegen in größerem Ausmaß in Humanplasma gebunden. Nach MEYER und GUTTMANN (1968) wurde Penicillin G zu 34% in Human- und zu 14% in Hundeserum gebunden. Oxacillin wurde zu 84-90% in Kaninchenserum (MEYER und GUTTMANN, 1968) bzw. 88% in Humanserum gebunden (WALTER und HEILMEYER, 1975). Cephacetril wurde zu etwa 25% in Humanserum gebunden. Hierbei scheint die R-Gruppe, welche an die 6-Aminopenicillansäure gekettet ist, die am meisten bestimmende Determinante in Bezug auf die Proteinbindung zu sein (KUNIN, 1964). Auf diese Weise sind die R-Gruppen etwa von Oxacillin (3-Phenyl-5-methyl-4-isoxazolyl-Penicillin) oder von Nafcillin (2-Oxyäthyl-1-naphthyl-Penicillin) stark bindend, während die 6-Aminopenicillansäure nur schwach bindend ist. Dies ist nicht überraschend, da 6-APS in allen Penicillinen vorkommt, gleich in welchem Ausmaß diese durch Serum gebunden werden.

Das Ausmaß der Bindung wird bestimmt durch die Konzentration von Wirkstoff und Albumin, durch den pH-Wert und durch die Gegenwart von Komponenten, die möglicherweise durch die gleichen Bindungskapazitäten des Albuminmoleküls gebunden werden können (KUNIN, 1967). ROLINSON und SUTHERLAND (1965) zeigten auf, daß die Gegenwart beispielsweise von Sulfonamiden in Mindestkonzentrationen von 100 mcg/ml die Bindungskapazitäten für Cloxacillin verringern können. Nach ANTON (1960) konnte Phenylbutazon die Sulfonamide von ihren Bindungsstellen in vitro verdrängen. Die in gepufferter Salzlösung gemachten in vitro-Ergebnisse können allerdings nicht unbedingt auf in vivo-Bedingungen übertragen werden. KUNIN (1964) stellte bei den Protein bindenden Stellen eine Spezifität für Penicillin fest, da Novobiocin, Tetracyclin und Probenecid, das als stark eiweißgebunden bekannt ist, nicht in der

Lage waren, gebundenes Penicillin zu verdrängen. Dagegen ist nach MEYER und GUTTMANN (1968) Probenicid in der Lage, Penicillin G zu verdrängen.

Außer der Antibiotikumkonzentration und der Art des Proteins hatte die gewählte Temperatur (40° oder 37°C, bzw. 37-38°C oder 2-5°C bei WOZNIAK, 1960) bei den durchgeführten Untersuchungen Auswirkungen auf die Eiweißbindung der Antibiotika (KLOTZ et al., 1950; WOZNIAK, 1960; SCHOLTAN und SCHMID, 1962; ROLINSON und SUTHERLAND, 1965). Die antibakterielle Aktivität eines Antibiotikums im Serum und in Testbouillon standen in engem Zusammenhang mit der Proteinbindung (COLVILLE und QUINN, 1961; JACKSON et al., 1961). Vergleiche zwischen der antibakteriellen Aktivität von Penicillinase-resistenten Penicillinen gegenüber Penicillin G-resistenten STaphylokokken demonstrierten den starken Effekt von Humanserum auf die antibakterielle Aktivität (KUNIN, 1966). Methicillin, obwohl wenig aktiv in Testbouillon, wurde nur in geringer Menge im Serum benötigt, um 99% des Inokulums abzutöten. Dagegen zeigte Dicloxacillin, welches am aktivsten in Testbouillon war, in Serum nach 6, 9 und 12stündiger Bebrütung eine sehr geringe Aktivität.

Außer der erwähnten Serumproteinbindung können die Antibiotika auch an Gewebeproteine gebunden werden. KUNIN und BUGG (1971) untersuchten die Bindung der Antibiotika an Kaninchengewebe und zeigten, daß die Polymyxingruppe, die Aminoglykosidgruppe sowie die Chloramphenicolgruppe stark gebunden wurden. Die Bindung der Betalaktamring-Antibiotika an Gewebeproteine erwies sich demgegenüber als gering (KUNIN, 1970). Nach ZIV et al., (1976) wurden Neomycin, Dihydrostreptomycin, Spiromycin und Polymyxin B zu mehr als 50% an Gewebeproteine, in diesem Fall speziell Eutergewebe, gebunden, während Benzylpenicillin, Ampicillin, Cephaloridin, Erythromycin, sowie auch, im Gegensatz zu KUNIN, Chloramphenicol zu weniger als 50% gebunden wurden. KUNIN (1971) und ZIV et al. (1976) vertraten die Ansicht, daß die Gewebebindung eines Antibiotikums von dessen Albuminbindung im Serum unabhängig ist.

2.3 BESTIMMUNG DER WIRKUNGSINTENSITÄT VON ANTIBIOTIKA IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

2.3.1 Milch und Mastitissekret vom Rind

Aktivitätsbestimmungen von Antibiotika werden grundsätzlich in künstlichen Nährmedien, die auf Peptonbasis hergestellt sind, durchgeführt (WALTER und HEILMEYER, 1975), wobei die Ergebnisse je nach Zusammensetzung des Nährmediums variieren können (WATERWORTH, 1978). Die Tatsache, daß je nach verwendetem Nährmedium eine unterschiedliche Wirkungsintensität gefunden werden kann, wirft die Frage nach der klinisch relevanten in vitro-Aktivität eines Chemotherapeutikums auf (HELM, 1977). Deshalb sollte eigentlich die Wirkungsintensität auch in den verschiedenen Körperflüssigkeiten getestet werden, in denen die Antibiotika in vivo wirken sollen.

Sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin sind Wirkungsintensitätsbestimmungen in verschiedenen Körperflüssigkeiten durchgeführt worden. AYNSLEY und HUGHES (1954) testeten die Aktivität von Neomycin in Testbouillon und Magermilch, wobei es zu einem Aktivitätsverlust des Neomycins in Magermilch kam. DEUBLER und COLE (1955) untersuchten die antibakterielle Aktivität von Neomycin, Streptomycin, Chloramphenicol, Polymyxin B, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin in Testbouillon (DIFCO), nicht erhitztem Mastitissekret mit Pseudomonas aeruginosa, gepoolter erhitzter Vollmilch, steriler Magermilch sowie in nicht erhitzter Rohmilch und erhitztem Mastitissekret. Der größte Aktivitätsverlust wurde in nicht erhitztem Mastitissekret beobachtet.

Von PRICE et al. (1955/56, 1957/58) wurde die Wirkungsintensität eines Antibiotikums gegenüber Micrococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae und Pseudomonas aeruginosa in pasteurisierter Vollmilch, in Magermilch und in Testbouillon untersucht. Tetracyclin-Präparate wurden

in stärkerem Ausmaß als die Penicillin-Präparate durch Milch in ihrer Wirkungsintensität beeinflußt. Für Chlortetracyclin, Tetracyclin und Dihydrostreptomycin wurden 20-30fach höhere Konzentrationen als in Testbouillon benötigt, um die gleiche antibakterielle Aktivität gegenüber den untersuchten Erregern in Milch zu besitzen.

KRABBENHOFT et al. (1965) beobachteten höhere MHK- und MBK-Werte von Chlortetracyclin, Dihydrostreptomycin, Neomycinsulfat, Benzylpenicillin, Bacitracin und Oxytetracyclin gegenüber verschiedenen Mastitiserregern in Magermilch als in Testbouillon.

Die antibakterielle Aktivität von Penicillin G gegenüber verschiedenen Erregern wurde von SHAHIDI und MARSHALL (1968) in Testbouillon mit Casein-Zusatz (2,5%), in gepoolter Milch von latent infizierten Vierteln und in Milch von Mastitisvierteln untersucht. Die MBK-Werte von Penicillin G waren in Mastitissekret am höchsten. Der Zusatz von Casein hatte einen steigernden Effekt im Hinblick auf die Wirkungsintensität.

Nach SHAHIDI und MARSHALL (1968) bewegten sich die MBK-Werte von Penicillin G gegenüber S.aureus zwischen 1,25 IE und 2 IE in Testbouillon und zwischen 4 bis 5 IE/ml in autoklavierter Vollmilch. Für Magermilch lag der MBK-Wert ebenfalls bei 4 IE/ml. Die Fettfraktion übte also keinen Effekt auf die Wirkungsintensität von Penicillin aus. Im Mastitissekret waren die MBK-Werte etwa 8mal höher als in autoklavierter Vollmilch. SHAHIDI und MARSHALL (1968) machten hierfür den infolge der Mastitis auftretenden Blutserumanstieg im Eutersekret verantwortlich.

Von KHAN und MARSHALL (1969) wurden Untersuchungen über die Wirkungsintensität von Antibiotika in Rohmilch und Testbouillon mit Casein-Zusatz (2,5%) durchgeführt. Bei allen untersuchten Antibiotika kam es zu einer Erhöhung der MBK-Werte in Milch. Bei Tetracyclin wurde die 5fache,

bei Erythromycin die 6,4fache, bei Neomycin die 8fache und bei Oxytetracyclin die 9fache Wirkstoffkonzentration benötigt, um die gleiche antibakterielle Aktivität wie in Testbouillon zu besitzen.

ZIV (1971) untersuchte die MBK von Penicillin G gegenüber S.aureus in Rohmilch und in Mastitissekret sowohl nach 6stündiger als auch nach 24stündiger Bebrütungszeit. Nach 6 Stunden betrug die MBK in Vollmilch 0,625 IE/ml, nach 24 Stunden 2,5 IE/ml. Im Mastitissekret betrug die MBK nach 6 Stunden 0,019 IE/ml, nach 24 Stunden 10,0 IE/ml. Zunächst bestand ein synergistischer Effekt zwischen Penicillin G und den antibakteriellen Faktoren im Mastitissekret. Nach 24 Stunden jedoch waren die MBK-Werte im Mastitissekret um das 9fache gestiegen.

2.3.2 Humanmedizinische Aspekte

GLÁZ (1959) ermittelte die MBK-Werte von Penicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin gegenüber S.typhi in menschlicher Galle. Tetracyclin zeigte in Galle einen deutlichen Wirkungsverlust, Penicillin G einen leichten Aktivitätsgewinn. Auch bei Chloramphenicol wurde in Leber- bzw. Duodenalgalle, aber nicht in Blasengalle, eine geringe Wirkungssteigerung festgestellt.

GARROD und WATERWORTH (1969) prüften die MHK-Werte von Gentamycin im hämolysierten (menschlichen) Blut, im Urin (pH 6,8) und in Testbouillon gegenüber E.coli und Pseudomonas aeruginosa. Dabei wurde ein Aktivitätsverlust von Gentamycin im Urin gegenüber Pseudomonas aeruginosa festgestellt. Bei E.coli war die Aktivität in Urin und Bouillon gleich.

HELM (1977) führte den Begriff der relativen Aktivität ein. Darunter ist das Verhältnis der Aktivität in Testbouillon zu der in Körperflüssigkeiten zu verstehen, wobei die Aktivität in Testbouillon gleich 1 gesetzt wurde.

Eine relative Aktivität von < 1 bedeutet eine relative niedrigere Aktivität in der entsprechenden Körperflüssigkeit, eine solche von > 1 eine höhere Aktivität. In neun sterilen Körperflüssigkeiten (Speichel, Plasmawasser, Liquor, Galle, Pleuraexsudat, Ascites, Ovarialcystenflüssigkeit, Fruchtwasser und Urin) wurde die antibakterielle Aktivität (MHK) mehrerer Antibiotika gegenüber verschiedenen Erregern anhand des Reihenverdünnungstests bestimmt. Gegenüber S.aureus verhielten sich die Betalaktam-Antibiotika Penicillin, Oxacillin und Cefazolin nicht einheitlich. Penicillin zeigte eine deutliche Wirkungssteigerung in Speichel (relative Aktivität 32 - 256), Plasmawasser (1 - 32) und Fruchtwasser (32). Die eiweißreichen Medien führten dagegen zu einem geringen Wirkungsverlust des Penicillins, beispielsweise bei Ascites (relative Aktivität 1/8 - 1), Pleuraexsudat (1/4 - 1) und Ovarialcystenflüssigkeit (1/4 - 1).

Oxacillin und Cefazolin zeigten gegenüber S.aureus eine etwa gleichartige Aktivität in den untersuchten Körperflüssigkeiten Speichel (Oxacillin 1/256 - 1/2, Cefazolin 1/512 - 1/16), Plasmawasser (Oxacillin 1/2 - 2, Cefazolin 1- 4), Ascites (Oxacillin 1/4 - 1/2, Cefazolin 1/4 - 1), Pleuraexsudat (Oxacillin 1/4 - 1/2, Cefazolin 1/4 - 1) sowie Ovarialcystenflüssigkeit (Oxacillin 1/4 - 1/2, Cefazolin 1/4 - 1/2). Penicillin und Cephalosporine wiesen gegenüber Enterobakterien in allen Körperflüssigkeiten mit Ausnahme von Urin einen mäßigen Wirkungsverlust auf.

2.4 ZUSAMMENSETZUNG DES TROCKENSEKRETS

Während der Trockenperiode kam es sowohl zu einer quantitativen als auch qualitativen Veränderung des Eutersekretes, und das Sekret zeigte eine seröse bis honigartige Beschaffenheit (WHEELOCK et al., 1967).

Die Milchmenge nahm stetig ab. Die Sekretmengen in der 3.Woche der Trockenperiode betrugen durchschnittlich 78 g, in der 4. Woche noch 43 g (ZIV und GORDIN, 1973). Drei Wochen vor dem Abkalben stieg die Sekretmenge wieder an. Mit dem Rückgang der Sekretmenge kam es auch zu einem Abfall von Lactose, Kalium, Casein und Milchfett (SMITH et al., 1967; WHEELOCK et al., 1967). Fett und Lactose nahmen bis auf < 1% ab (SMITH et al., 1967). Außerdem kam es zu einem Abfall von α-Lactalbumin und ß-Lactoglobulin (CARROLL, 1961 und WHEELOCK et al., 1967). Die Konzentrationen von Natrium und Chlor nahmen ebenfalls ab, allerdings weniger stark ausgeprägt. Innerhalb von 8 Tagen nach dem Trockenstellen (WHEELOCK et al., 1967) waren die Natrium-, Chlor- und Kaliumkonzentrationen des Trockensekrets ähnlich den Konzentrationen im Blut. Mit dem Versiegen der Milchsekretion kam es andererseits zu einem Anstieg der Trockensubstanz, des Gesamtproteins, des Globulins und des Albumins, wobei besonders der Anstieg von Albumin auffällt (CARROLL, 1961; SMITH et al., 1967; ZIV und GORDIN, 1973). Nach CARROLL (1961) kam es zu einem 3fachen Anstieg von Immunglobulinen und zu einem 4fachen Anstieg von Albumin. Bei allen diesen Veränderungen gab es große individuelle Schwankungen (WHEELOCK et al., 1967; ZIV und GORDIN, 1973), die nicht in Beziehung zu bringen waren mit der vorhergehenden Gesamtmilchleistung, der Anzahl der Laktationen oder dem wöchentlichen Milchertrag in den letzten vier Wochen der Laktation (ZIV und GORDIN, 1973). Der Albumingehalt stieg von 8 g/100 g am 14. Tag auf 20 g/100 g am 38. Tag der Trokkenperiode. ZIV und GORDIN (1973) zeigten auf, daß es, im Gegensatz zu den anderen erwähnten Autoren, zu einem, wenn auch geringen, Anstieg von Casein kommt (0,5 g/100 g am 14. Tag auf 0,6 g/100 g am 38. Tag).

Nach ZIV und GORDIN (1973) waren die Globulin- und Albuminkonzentrationen in irritierten oder chronisch infizierten Vierteln während der Trockenperiode bedeutend höher im Vergleich zu normalen Vierteln. Der Albumingehalt zeigte die doppelten Werte im Vergleich zu normalen Eutern.

Diesen erhöhten Albumin- und Globulinkonzentrationen im Trockensekret erkrankter Euterviertel sollte im Hinblick auf die Eiweißbindung von Antibiotika Beachtung geschenkt werden, da Protein-gebundene Antibiotika mikrobiologisch inaktiv sind. Nach ZIV et al. (1976) wurden Cloxacillin, Novobiocin und Phenoxymethylpenicillin zu mehr als 50% vom Trockensekret gebunden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Trockensekret

In die Untersuchungen wurden 32 Trockensekretproben aus 32 gesunden Eutervierteln von 16 Kühen einbezogen. Sämtliche Proben stammten aus der Phase des 4. bis 18. Tages der Trockenperiode. Als Spendertiere standen Kühe der Rasse "Deutsches Fleckvieh" aus dem Bestand der Staatlichen Versuchsgüterverwaltung Grub bei München zur Verfügung. Keines der Versuchstiere war innerhalb der letzten acht Wochen mit antimikrobiellen Arzneimitteln behandelt worden.

3.1.2 Milch und Mastitissekret

Die 18 verwendeten Viertelgemelkproben (Anfangsgemelk) stammten aus 14 gesunden Eutervierteln von 13 Kühen unterschiedlichen Alters und Laktationsstadiums.Die neun verwendeten Mastitissekretproben (Anfangsgemelk) wurden aus vier Eutervierteln mit subklinischer Mastitis von drei Kühen entnommen. Die Versuchskühe stammten ebenfalls aus der Staatlichen Versuchsgüterverwaltung Grub bei München und waren innerhalb der letzten acht Wochen nicht mit antimikrobiellen Arzneimitteln behandelt worden.

3.1.3 S.aureus-Teststämme

Als Teststämme dienten 47 frische S.aureus-Isolate aus aseptisch entnommenen Viertelgemelkproben von Kühen mit subklinischer Mastitis aus dem Einzugsgebiet des Tiergesundheitsdienstes Bayern in Grub

3.1.4 Antibiotika-Testsubstanzen

a) Penicillin G-Kalium (BAYER), 1578 IE/mg
b) Oxacillin (BAYER), 903 mcg/mg

c) Cephalonium (GLAXO), 1000 mcg/mg
d) Cephacetril (CIBA-GEIGY), 980 mcg/mg

3.2 METHODIK

3.2.1 Gewinnung und Voruntersuchung der Eutersekretproben

Die Eutersekretproben (Trockensekret, Milch und Mastitissekret) wurden unmittelbar vor dem Morgen- oder Abendmelken nach der Methode von DIERNHOFER (1950) aseptisch entnommen. Nach Säuberung der Euterhaut des betreffenden Euterviertels und nach sorgfältiger Desinfektion der Zitzenhaut wurden nach Verwerfen der ersten Strahlen etwa 200 ml Sekret in einen sterilen Erlenmeyerkolben gemolken. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme unter Wärmeisolierung in das Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern in Grub bei München gebracht, wo sie unverzüglich untersucht wurden. Zwischen Probenahme und Untersuchung lagen in der Regel zwei, maximal drei Stunden. Einige, bei der Beschreibung der Versuche eigens gekennzeichnete Trokkensekretproben wurden sofort tiefgefroren und später untersucht.

Jede Eutersekretprobe wurde unmittelbar nach der Probenahme bakteriologisch untersucht (Kulturverfahren mit Blutagar). Der Zellgehalt der Milch- und Mastitissekretproben wurde mit Hilfe des California-Mastitis-Tests indirekt bestimmt. Es wurden nur die Versuche mit bakteriologisch negativen Trockensekret- oder Milchproben ausgewertet. Die Mastitissekretproben enthielten hämolysierende Streptokokken. S.aureus konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

DIN-Methode

Die Reinsubstanzen Penicillin G, Oxacillin sowie Cephacetril wurden in sterilem destilliertem Wasser gelöst, während das schlecht wasserlösliche Cephalonium zuerst

in Dimethylsulfoxid (MERCK, Art. 802912) gelöst und dann in destilliertem Wasser weiterverdünnt werden mußte. Es wurden Stammlösungen mit einer Antibiotikum-Konzentration von 2000 IE bzw. mcg/ml hergestellt, die zu je 2 ml abgefüllt unter - 20°C aufbewahrt wurden. Zur Bestimmung der MBK wurden zwei Methoden, die DIN- und die Direkt-Methode verwendet. Bei der DIN-Methode wurden 2 ml des jeweiligen Antibiotikums (Wirkstoffkonzentration von 2000 mcg/ml) mit 13,62 ml destilliertem Wasser verdünnt, so daß bei einem Volumen von 15,62 ml eine Wirkstoffkonzentration von 256 mcg/ml vorlag. Ausgehend von dieser Wirkstoffkonzentration wurde nach dem Norm-Entwurf DIN 58940, Teil 5 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976) anhand des folgenden Schemas eine Verdünnungsreihe in Testbouillon (Mueller-Hinton-Bouillon, DIFCO) bzw. im entsprechenden Untersuchungsmaterial (Trockensekret, Milch, Mastitissekret) angelegt:

Mischung					
Wirkstoff		Testbouillon bzw. Untersuchungsmaterial Menge Volumenteile	Gesamtmenge Volumenteile	Erreichte Konzentration	Endkonzentration
Konzentration mcg/ml	Menge Volumenteile			mcg/ml	mcg/ml
256	1	3	4	64	32
256	1	7	8	32	16
32	2	2	4	16	8
32	1	3	4	8	4
32	1	7	8	4	2
4	2	2	4	2	1
4	1	3	4	1	0,5
4	1	7	8	0,5	0,25
0,5	2	2	4	0,25	0,125
0,5	1	3	4	0,125	0,063
0,5	1	7	8	0,063	0,031

Beim Pipettieren von höheren zu niedrigeren Konzentrationen wurde jeweils eine neue Pipette verwendet. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurden die einzelnen Röhrchen mit Hilfe eines automatischen Schüttlers geschüttelt. Aus den elf Röhrchen mit den unterschiedlichen "erreichten Konzentrationen" wurde jeweils 1 ml in ein neues Röhrchen pipettiert und dazu 1 ml des Inokulums einer 1:1000 mit Untersuchungsmaterial (Trokkensekret, Milch, Mastitissekret) bzw. steriler Mueller-Hinton-Bouillon (DIFCO) verdünnten S.aureus-Übernachtbouillon hinzugefügt, so daß die "Endkonzentration" beispielsweise im ersten Röhrchen der neuen Reihe 32 mcg/ml und im elften 0,03 mcg/ml betrug.

Zur Herstellung des Inokulums wurde Material von jeweils vier Kolonien der frisch überimpften S.aureus-Blutagarkulturen mit einer Platinöse aufgenommen und in 4 ml Mueller-Hinton-Bouillon (DIFCO) überimpft. Danach erfolgte die Bebrütung bei 37°C für 16 $\pm$ 2 Stunden. Da mit Hilfe der Koch'schen Zählung festgestellt wurde, daß die Übernachtbouillon im Durchschnitt etwa 5×10^8/ml vermehrungsfähige Keime enthielt, wurde generell bei allen Versuchen von einer Verdünnung von 1:1000 (= ca. 5×10^5 Keime pro ml) ausgegangen, um die geforderte Keimzahl von 2×10^5 bis 2×10^6 vermehrungsfähigen Keimen je ml in den elf Röhrchen der "Endkonzentrationen" zu erreichen. Nach intensivem Schütteln wurde die mit dem Inokulum versetzte Verdünnungsreihe bei 37°C für 16 $\pm$ 2 h bebrütet.

Direkt-Methode

Die Bestimmung der MBK in Form einer alternativen Methode erfolgte in der Weise, daß eine wässerige Lösung des Antibiotikums in abgestuften Konzentrationen (um den Faktor 2 fallende geometrische Reihe) den einzelnen Trokkensekretproben direkt zugegeben wurde (Direkt-Methode). 3,2 ml des jeweiligen Antibiotikums mit einer Wirkstoffkonzentration von 2000 mcg/ml wurden mit 1,8 ml destilliertem Wasser verdünnt, so daß bei einem Volumen von

5 ml eine Wirkstoffkonzentration von 1280 mcg/ml vorlag. Ausgehend von dieser Wirkstoffkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der die Wirkstoffkonzentration bei jedem Verdünnungsschritt um die Hälfte abnahm. Hierzu wurden jeweils 3 ml einer bestimmten Wirkstoffkonzentration mit 3 ml destilliertem Wasser des folgenden Röhrchens verdünnt, so daß die Wirkstoffkonzentration in diesem Röhrchen um die Hälfte niedriger lag. Beim Pipettieren von höheren zu niedrigeren Konzentrationen wurde jeweils eine neue Pipette verwendet. Mit Hilfe eines automatischen Schüttlers wurden die einzelnen Röhrchen zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten geschüttelt. In der Verdünnungsreihe betrug die Wirkstoffkonzentration des ersten Röhrchens 1280 mcg/ml, im letzten Röhrchen 1,25 mcg/ml. Diese wässerigen Antibiotikum-Lösungen wurden im Verhältnis von 1:40 dem Trockensekret bzw. der Testbouillon zugegeben. Aus jedem der elf Röhrchen, die die Antibiotikum-Lösungen enthielten, wurden jeweils 0,4 ml zu jeweils 15,6 ml antibiotikafreien Trokkensekret- bzw. Testbouillonproben hinzugefügt. Trockensekret und Testbouillon enthielten jeweils 2 - 5 x 10^5 vermehrungsfähige Staphylokokken pro ml. Von den jeweils 16 ml enthaltenden elf Röhrchen wurden nach intensivem Schütteln jeweils 2 ml in ein neues Röhrchen überführt und 16 $\pm$ 2 Stunden bei 37°C bebrütet.

Sowohl bei der DIN- als auch bei der Direkt-Methode wurden nach erfolgter Bebrütung und nach intensivem Schütteln aus jedem Röhrchen mit Hilfe einer normierten Platinöse 0,01 ml entnommen und auf einem Drittel einer Rinderblut-Agarplatte ausgestrichen. Nach 24 bis 48stündiger Bebrütung der Platten bei 37°C wurde die Koloniezahl bestimmt. Bei der DIN-Methode stellte die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei welcher auf der Blutagarplatte erstmalig nach kontinuierlicher Abnahme der Koloniezahl nur eine oder keine S.aureus-Kolonie festzustellen war, die MBK dar. Dagegen erwies es sich bei der Direkt-Methode im Verlauf der Untersuchungen als günstig, die Wirkstoffkonzentration, bei welcher erstmalig nach kontinuierlicher Abnahme der Koloniezahl zwei S.aureus-Kolonien festzustellen waren, als MBK festzulegen. Die MBK-Bestimmungen wurden parallel in Testbouillon (Muel-

ler-Hinton Broth, DIFCO) und in dem jeweiligen Untersuchungsmaterial durchgeführt. Außerdem wurden stets Kontrollröhrchen (ohne Wirkstoffzusatz) mitgeführt. Die MBK-Bestimmung mit Testbouillon galt als Standardmethode.

3.2.3 Bakterizidie-Kinetik

Es wurde wiederum eine Verdünnungsreihe nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 für Testbouillon und Trockensekret bis zur 4. Stufe ("erreichte Konzentration" 8 IE bzw. mcg/ml) hergestellt. Aus dem Röhrchen der 4. Stufe (8 IE bzw. mcg/ml) wurden 2 ml in ein neues Röhrchen überpipettiert und 2 ml 1:1000 in Testbouillon oder Untersuchungsmaterial verdünnte S.aureus-Übernachtbouillon hinzugefügt. Die 4 ml enthielten 4 mcg/ml Wirkstoff und 2 - 5 x 10^5 vermehrungsfähige Keime pro ml. Wachstumskontrollen (kein Wirkstoffzusatz) wurden mitgeführt. Sämtliche Proben wurden 20 Stunden bei 37°C bebrütet. Aus den Kontrollröhrchen (Testbouillon und Trockensekret) und aus den mit Wirkstoff beschickten Röhrchen wurden jeweils 0,5 ml zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt 0) sowie nach 2, 4 und 20 Stunden entnommen und auf die Keimzahl untersucht. Zu diesem Zweck wurde jede 0,5 ml-Probe in mehreren Verdünnungsschritten im Verhältnis von 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Jeweils 0,1 ml jeder Verdünnung wurde mit der Pipette entnommen, auf die Rinderblut-Agarplatte übertragen und auf der Oberfläche ausgespatelt. Es wurde stets eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurde die S.aureus-Koloniezahl bestimmt.

3.2.4 Vergleichende Prüfung des Abbaus von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium in Trockensekret und Testbouillon

Nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 wurden für Trockensekret und Testbouillon Verdünnungsreihen angelegt. Aus den Röhrchen mit den "erreichten Konzentrationen" 16, 2 und 0,5 mcg/ml Wirkstoff wurden jeweils 2 ml entnommen und mit 2 ml einer 1:1000 mit Trockensekret bzw. Testbouil-

lon verdünnten S.aureus-Übernachtbouillon versetzt. Die nun 8, 1 und 0,25 mcg/ml Wirkstoff enthaltenden Röhrchen wurden 20 Stunden bei 37°C bebrütet. Zu Versuchsbeginn (unmittelbar vor der Bebrütung) und nach 20 Stunden der Bebrütung wurden von jeder Probe 0,5 ml entnommen und tiefgefroren (< - 20°C). Die 8 und 1 mcg/ml Wirkstoff enthaltenden Proben wurden nach dem Auftauen jeweils 1 : 10 mit Trockensekret bzw. Testbouillon verdünnt. Danach wurden die Proben auf ihren Gehalt an Penicillin G und Oxacillin geprüft. Der Nachweis erfolgte mit dem Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtests. Als Testkeim wurde S.lutea (ATCC 9341), als Testagar Antibiotic Medium 1 (DIFCO), pH 6,5-6,6, verwendet. Die Einsaatdichte der Keime schwankte zwischen 5×10^5 und 1×10^7 /ml Agar. Der mit Testkeimen versetzte Agar wurde auf Glasplatten mit Plexiglasrahmen ausgegossen. Dazu wurden 19 x 19 cm große Plexiglasrahmen auf 22 x 22 cm große Glasplatten gelegt und die Platten unter Wasserwaagen-Kontrolle in plane Position gebracht. Die Schichtdicke des Agars betrug 2,2 mm, der Lochdurchmesser 13 mm. Pro Platte wurden 25 Löcher ausgestanzt und jeweils 0,2 ml Trockensekret bzw. Testbouillon einpipettiert. Bei jeder Platte wurde als Bezugssystem eine Penicillin G-Standardreihe (Hoechst, 1650 IE/mg) bzw. Oxacillin-Standardreihe (Bayer, 903 mcg/ml) mitgeführt. Eine Penicillin G- bzw. Oxacillin-Lösung (100 IE bzw. mcg/ml m/15 Phosphatpuffer, pH 6,5) wurde mit hemmstofffreiem Trockensekret bzw. Testbouillon im Verhältnis 1:200 verdünnt und von dem 0,5 IE bzw. mcg/ml enthaltenden Trockensekret bzw. Testmedium eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Stufen 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 und 1/64 angelegt. Die zu untersuchenden Proben (Trockensekret, Testbouillon) wurden in einem parallelen Doppelansatz mit Penicillin G bzw. Oxacillin versetzt. Die Bebrütung erfolgte bei 32 - 35°C für 16-18 Stunden.

Nach dem gleichen Prinzip wurde unter Verwendung eines anderen Testkeimes der Gehalt an Cephalonium bestimmt. Es wurde B.stearothermophilus var. calidolactis C 953, Antibiotic Medium 1 (DIFCO) pH 6,5 eingesetzt. Die Einsaatdichte schwankte zwischen 5×10^5 und 1×10^7 Keime pro

ml Agar. Die Plexiglasrahmen wurden für die Bebrütung mit selbstklebender Folie (Sprint Marking Film, transparent, Art.Nr. 13438 der 3M-Company, Düsseldorf) abgedeckt. Als Bezugssystem wurde eine Cephalonium-Standardreihe in Trockensekret und Testbouillon mitgeführt. Die Bebrütung erfolgte bei 6o - 65°C für ca. 5 Stunden. Bei dem Agardiffusionsverfahren besteht zwischen Hemmhofdurchmesser und Wirkstoffkonzentration eine logarithmische Beziehung, so daß bei graphischer halblogarithmischer Darstellung die Standardkurve zur Geraden wird. Die Hemmhofgrößen der zu testenden Milchproben wurden in die Standardgerade interpoliert, um die Wirkstoffkonzentrationen bestimmen zu können. Die Darstellung der Regressionsgeraden der Standardreihe und die Zuordnung der Hemmhofgrößen der zu testenden Milchproben zu den entsprechenden Verdünnungsstufen des Standards erfolgte mit einem Rechengerät unter Verwendung eines entsprechenden Programms. Die Umrechnung von der Verdünnungsstufe zur Wirkstoffkonzentration der Milchprobe wurde anhand einer Tabelle vorgenommen.

3.2.5 Vergleichende Untersuchungen über den mikrobiologisch aktiven Anteil von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium in Trockensekret und Testbouillon

Diese Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Einmal wurden in Trockensekret und Testbouillon nach dem Norm-Entwurf DIN 5894o Verdünnungsreihen mit diesen drei Antibiotika angelegt. Als Testkonzentration diente o,5 IE bzw. mcg/ml Wirkstoff ("DIN-Verfahren").
Zum anderen wurde stets parallel ein anderes Verdünnungsschema angewendet. 1 ml der Antibiotika-Stammlösung von 2ooo IE bzw. mcg/ml wurde 1:1oo in sterilem destillierten Wasser verdünnt. o,5 ml dieser Verdünnung wurde zu 19,5 ml Trockensekret bwz. Testbouillon gegeben, so daß die gleiche Wirkstoffkonzentration von o,5 IE bzw. mcg/ml wie beim "DIN-Verfahren" vorlag ("Direktverfahren").

Die entsprechenden, nach dem "DIN-Verfahren" bzw. dem "Direktverfahren" verdünnten Proben wurden im Agardiffusionsverfahren, wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben, vergleichend auf den mikrobiologisch aktiven Anteil, gemessen an den Hemmhofgrößen, untersucht.

3.2.6 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK wurde mit Hilfe eines Multipoint-Inokulators (AM 80 Automatic Inoculator, Dynatech Deutschland GmbH , Plochingen) ermittelt. Es wurde die Agar-Verdünnungsmethode nach dem Norm-Entwurf DIN 58940, Teil 6 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976) angewendet.

3.2.7 Penicillinasenachweis bei S.aureus

Hierzu wurde die von ROSSELET (1977) modifizierte Methode nach FOLEY und PERRET (1962), beschrieben von GEDEK (1978), verwendet. Nutrient Agar (CM 3 OXOID) mit 1% Stärkezusatz (Stärke löslich, Art. 1253 Merck) wurde autoklaviert und zu etwa 18 ml pro Petri-Schale (9 cm Durchmesser) ausgegossen.
53,1 g Kaliumjodid, neutral, (Art. 5043, Merck) wurden in 100 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,0) gelöst, mit 2,03 g Jod, doppelt sublimiert, (Art.4760, Merck) versetzt und einen Tag stehen gelassen. Vor der Testung wurde diese Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und 1% Penicillin G-Kalium dazugegeben. Auf die Stärke-haltige Agarplatte wurde mit der Öse Material von S.aureus-Kolonien so verbracht, daß Makrokolonien entstehen konnten. Nach etwa 18stündiger Bebrütung wurden etwa 2 ml der Penicillin G-haltigen Jod-Jodkalilösung auf die Mitte der Petrischalen verbracht und gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Der Agar verfärbte sich sofort dunkelblau bis schwarz. Nach Stehenlassen der Platten bei Zimmertemperatur für 15 - 30 Minuten zeigten Penicillinase-Bildner ringförmige Entfärbungszonen um die Makrokolonie. Penicillinase-negative Kolonien hatten

keine derartigen Entfärbungszonen.
Für die Versuche wurden nur Penicillinase-sensible S.aureus-Stämme mit der MHK von ≤ 0,06 mcg/ml verwendet.

3.3. VERSUCHE UND VERSUCHSERGEBNISSE

3.3.1 MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Trockensekret und Testbouillon (DIN-Methode)

Mit einer normierten Methode wurde geprüft, ob und gegebenenfalls welche Unterschiede in der Bakterizidie von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium gegenüber verschiedenen S.aureus-Stämmen in Trockensekret einerseits und Testbouillon (Standardmethode) andererseits bestehen. Bei diesen Versuchen kam es darauf an, einmal die Trockensekrete in kürzester Frist nach der Entnahme zu testen und zum anderen nur frisch isolierte, aus Rindermastitis-Fällen stammende S.aureus-Kulturen zu verwenden, um die klinische Bedeutung besser abschätzen zu können.

Für die Testung von Trockensekret und Testbouillon wurde eine völlig identische Methode verwendet. Die Verdünnungsreihe erfolgte nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976), hier als "DIN-Methode" bezeichnet. Die Trockensekretprüfung erfolgte in der Weise, daß bei der Herstellung der Verdünnungsreihe lediglich die Testbouillon durch Trockensekret ersetzt wurde. Die vergleichende Prüfung der Bakterizidie der drei Betalaktam-Antibiotika erfolgte anhand von 18 Trockensekretproben und der Testbouillon (Abb. 1). Alle Trockensekrete wurden in der Zeit vom 4. bis 9. Tag nach dem Trockenstellen entnommen, und für jede der 18 Testungen wurde ein anderer S.aureus-Stamm verwendet.

Aus der Abbildung 1 geht hervor, daß die MBK-Werte der drei geprüften Antibiotika in der Testbouillon bedeutend niedriger lagen als im Trockensekret.

Da aus dieser Abbildung jedoch nicht ersichtlich ist, wie groß die Unterschiede im Einzelfall waren, erfolgte eine gesonderte, nach den Einzelfällen aufgeschlüsselte Darstellung der MBK-Werte (Tab. 1). Hierbei ergaben sich bei jeder der 18 Testungen höhere MBK-Werte im Trockensekret als in der mit der gleichen Methode geprüften Testbouillon. Jedoch lagen je nach Einzelfall mehr oder weniger große Differenzen in den MBK-Werten von Trockensekret und Testbouillon vor. Der aus dem Verhältnis von MBK-Wert des Trockensekrets zu MBK-Wert der Testbouillon gebildete Faktor erlaubt eine gute Abschätzung dieser Differenzen. Der Faktor lag im Extremfall bei zwei bis neun Verdünnungsstufen.

Für Penicillin G wurden Faktoren zwischen fünf und neun Stufen errechnet. Nur bei zwei der 18 aufgeschlüsselten Einzelergebnisse war der Faktor nicht genau bestimmbar, da die MBK-Werte über 32 mcg/ml, der höchsten noch in die Testungen einbezogenen Antibiotikakonzentrationen, lagen.

Bei den mit Oxacillin durchgeführten Testungen lagen die meisten MBK-Werte im Trockensekret (15 von 18) über 32 mcg/ml, außerdem lagen zwei MBK-Werte in Testbouillon über 4 mcg/ml, so daß nur zwei Faktoren, die bei sechs Stufen lagen, genau errechnet werden konnten. Die übrigen Faktoren lagen in einem Bereich von mindestens drei bis mindestens sechs Stufen.

Für zwölf der 18 mit Cephalonium durchgeführten MBK-Bestimmungen konnten die Faktoren ebenfalls nicht genau bestimmt werden, da die MBK-Werte im Trockensekret oberhalb der noch getesteten Wirkstoffkonzentration von 32 mcg/ml lagen. Außerdem lag ein MBK-Wert in Testbouillon über 4 mcg/ml, so daß nur fünf genau bestimmbar waren. Sie lagen zwischen sieben und neun Stufen.

3.3.2 MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Milch, Mastitissekret und Testbouillon

Zu Vergleichszwecken wurden die mit Trockensekret vorgenommenen Versuche auch mit Milch und Mastitissekret anstelle von Trockensekret durchgeführt (Abb. 2-4).

Anhand von sieben Milchproben aus verschiedenen Eutervierteln wurden Penicillin G, Oxacillin und Cephacetril, anhand von elf Milchproben Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium getestet (Abb. 2-3). Die Milchproben waren Viertelanfangsgemelk-Proben aus gesunden Euterviertеln. Bei jeder Testung wurde ein anderer S.aureus-Stamm verwendet. Fünf von elf der mit Cephalonium durchgeführten Testungen wurden parallel in Rohmilch und erhitzter Milch durchgeführt.

In die mit nicht erhitztem und erhitztem Mastitissekret vorgenommenen Testungen wurden Penicillin G, Oxacillin und Cephacetril einbezogen (Abb. 4). Die Mastitissekrete stammten aus Vierteln mit subklinischer Mastitis.

Die mit gleicher Methode (DIN-Methode) geprüften Proben aus verschiedenen Medien wiesen MBK-Werte auf, die mit Ausnahme der nicht erhitzten Mastitissekrete keine nennenswerten Abweichungen zeigten. Die MBK-Werte der drei Antibiotika im nicht erhitzten Mastitissekret lagen erheblich höher als in den anderen Medien.

3.3.3 Abbau des Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon im Verlaufe der Bebrütung

Um die Gründe für das unterschiedliche Niveau der MBK-Werte von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium in Trockensekret und Testbouillon (Abb. 1) zu ermitteln, wurde geprüft, ob während der Bebrütung bei 37°C ein unterschiedlicher Abbau der Antibiotika in den beiden verglichenen Medien erfolgte. Als Methode zur Ermitt-

lung eines eventuellen Abbaus der Antibiotika in den beiden Medien wurde das Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtests herangezogen. Als Testkeime fungierten Sarcina lutea 9341 und Bacillus stearothermophilus var. calidolactis C 953. Es wurden verschiedene Antibiotika-Konzentrationen geprüft (0,8; 0,25 und 0,1 IE bzw. mcg/ml). Die durchschnittliche Hemmhofgröße der wirkstoffhaltigen Medien unmittelbar vor und nach erfolgter Bebrütung galt als Maßstab der mikrobiologischen Aktivität des Antibiotikums (Tab. 2-4).

Die Abnahme der Hemmhofgrößen nach erfolgter 20stündiger Bebrütung der beiden Medien war bei Penicillin G sehr gering und zeigte bei beiden Testmedien keine signifikanten Unterschiede (Tab. 2). Das gleiche Ergebnis erbrachten die Untersuchungen mit Oxacillin (Tab. 3). Die Abnahme der Hemmhofgrößen erfolgte bei den Cephaloniumhaltigen Testmedien in vergleichsweise größerem Umfang, ohne jedoch innerhalb der beiden geprüften Medien signifikante Unterschiede zu erbringen (Tab. 4).

3.3.4 Mikrobiologisch aktiver Anteil des Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Nachdem die in beiden Medien gleichermaßen geringgradige Abnahme der mikrobiologischen Aktivität des Antibiotikums als Ursache für die beobachteten Unterschiede in den MBK-Werten nicht in Frage kam, wurde geprüft, ob bei Trockensekret und Testbouillon Unterschiede im mikrobiologisch verfügbaren Anteil des Antibiotikums nach unterschiedlicher Vorbehandlung vorlagen.

Als Maß für die mikrobiologische Aktivität der drei untersuchten Betalaktam-Antibiotika galten die Hemmhofgrößen im Agardiffusionsverfahren. Die Basis der MBK-Bestimmung war bei Trockensekret und auch bei Testbouillon die Herstellung der Verdünnungsreihe nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976). Diese

Verdünnungsmethode wurde hier als DIN-Methode bezeichnet. Als Direkt-Methode galt eine Verdünnungsmethode, bei der die endgültige Antibiotika-Konzentration durch eine Verdünnung der wässerigen Antibiotika-Stammlösung im Verhältnis 1:4o in Trockensekret bwz. Testbouillon erreicht wurde. Die Hemmhofgrößen der mit den beiden Methoden verdünnten Testmedien wurden für die einzelnen geprüften Antibiotika gegenübergestellt (Tab. 5-8).

Die mit der DIN-Methode erreichten durchschnittlichen Hemmhofgrößen waren beim Trockensekret meist erheblich kleiner als bei der Testbouillon, während die mit der Direkt-Methode erzielten durchschnittlichen Hemmhofgrößen keine derartigen Abweichungen zwischen Trockensekret und Testbouillon zeigten. Das bedeutet, daß bei Anwendung der DIN-Methode in der Testbouillon wesentlich mehr mikrobiologisch aktives Antibiotikum vorlag als im Trockensekret. Die DIN-Methode war die Grundlage für die MBK-Bestimmung in den untersuchten Medien. Bei einigen Testungen wurden für die einzelnen Hemmhofgrößen die entsprechenden Antibiotika-Gehalte errechnet (Tab. 9). Hierzu wurden die Hemmhofgrößen der nach der DIN- und nach der Direkt-Methode getesteten Trockensekretproben den entsprechenden Verdünnungsstufen des Standards (Penicillin G, Oxacillin, Cephalonium) mit Hilfe eines Rechengerätes unter Verwendung eines entsprechenden Programms zugeordnet. Die Umrechnung von der Verdünnungsstufe zur Wirkstoffkonzentration des Trockensekrets wurde anhand einer Tabelle vorgenommen. Dabei wurden die mittels Direkt-Methode erhaltenen Hemmhofgrößen gleichgesetzt mit 1oo% mikrobiologisch verfügbaren Antibiotikums, also o,5 IE bzw. mcg/ml. Die mit der DIN-Methode erhaltenen Wirkstoffkonzentrationen erreichten bei keiner der mit frischem Trockensekret durchgeführten Testungen 1oo% an mikrobiologisch verfügbaren Antibiotikums. Bei Penicillin G schwankten die mit der DIN-Methode erreichten Wirkstoffkonzentrationen zwischen o,o1 und o,28 IE/ml, bei Oxacillin zwischen o,13 und o,24 mcg/ml und bei Cephalonium zwischen o,o6 und o,48 mcg/ml.

3.3.5 Bakterizidie-Kinetik

Es war weiter zu prüfen, wie hoch die Abtötungsrate von S.aureus in der zeitlichen Folge bis zur 2o. Stunde nach der Beimpfung, dem Ablesezeitpunkt der MBK-Bestimmung, lag. Gemessen wurde während der 2., 4. und 2o. Stunde nach der Inokulation. Mit Hilfe dieser sogenannten Abtötungskurven waren detaillierte Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und Mikroorganismus während der 2ostündigen Bebrütung zu erzielen (Abb. 5-12).

Sämtliche mit den verschiedenen S.aureus-Stämmen vorgenommenen Testungen wiesen zwei gemeinsame Charakteristika auf. Zu Versuchsbeginn, der Stunde O, lag die Zahl der vermehrungsfähigen Staphylokokken trotz gleicher Einsaatgröße und gleicher Herstellung der Wirkstoffkonzentration (DIN-Methode) im Trockensekret immer etwas niedriger als in der Testbouillon. Zum anderen war das Wachstum aller getesteten S.aureus-Stämme bei gleicher Einsaatgröße und ohne Wirkstoffzusatz in Testbouillon besser als in Trockensekret.

Anhand der Abtötungskurven können die acht Versuche in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppe 1 umfaßte drei mit frischem Trockensekret durchgeführte Versuche mit Wachstumskontrollen (Abb. 5-7). Nach 2ostündiger Bebrütung konnten im Trockensekret signifikant höhere Keimzahlen nachgewiesen werden als in der Testbouillon. Die Anzahl vermehrungsfähiger Keime in Testbouillon war um mindestens eine bis zu über zwei Zehnerpotenzen niedriger als im Trockensekret. Dagegen wiesen die Abtötungskurven der Gruppe 2 (Abb. 8-12) nur geringe Unterschiede in der Überlebensrate zwischen Trockensekret und Testbouillon nach 2ostündiger Bebrütung auf. Die Anzahl vermehrungsfähiger Staphylokokken schwankte maximal um eine Zehnerpotenz, meist waren die Differenzen noch geringer. Die Gruppe 2 umfaßte die Testungen mit tief-

gefrorenem Trockensekret (Abb. 9-12). Möglicherweise steht der Befund, daß keine signifikanten Unterschiede nach 20stündiger Bebrütung in der Anzahl vermehrungsfähiger Keime in Trockensekret und Testbouillon festzustellen waren, in Zusammenhang mit dem Tiefgefrieren der Trockensekrete. Bei einer einzigen Testung mit frischem Trockensekret (Abb. 8) wurde der gleiche Befund erstellt.

3.3.6 MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Trockensekret und Testbouillon (Direkt-Methode)

Da die Prüfung des mikrobiologisch aktiven Anteils des Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon nach unterschiedlicher Vorbehandlung ergab, daß nach Anwendung der DIN-Methode im Trockensekret weniger mikrobiologisch aktives Antibiotikum vorlag als in der Testbouillon und die Unterschiede zwischen Trockensekret und Testbouillon nach Anwendung der Direkt-Methode nur gering waren, wobei die DIN-Methode die Grundlage der durchgeführten MBK-Bestimmungen war, mußte geprüft werden, ob und gegebenenfalls welche Unterschiede in der Bakterizidie von Penicillin G; Oxacillin und Cephalonium gegenüber verschiedenen S.aureus-Stämmen in Trockensekret und Testbouillon unter Einsatz der Direkt-Methode bestehen.

Die Direkt-Methode ist eine Verdünnungsmethode, bei der die endgültigen Antibiotikakonzentrationen durch eine 40fache Verdünnung der wässerigen Antibiotika-Lösungen in Trockensekret bzw. Testbouillon hergestellt wurden.

Es wurden nur frisch entnommene Trockensekretproben für die Untersuchung verwendet. Alle Trockensekrete stammten aus der Zeit vom 4. bis 7. Tag nach dem Trockenstellen. Für jede Untersuchung wurde ein anderer frisch isolierter, aus Rindermastitisfällen stammender S.aureus-Stamm verwendet.

Die MBK-Werte der drei geprüften Betalaktam-Antibiotika waren bis auf eine Ausnahme im Trockensekret höher als

in Testbouillon (Abb. 13). Die > 4 mcg/ml liegenden MBK-Werte in Testbouillon wurden bei 8 mcg/ml eingetragen. Eine nach Einzelfällen aufgeschlüsselte Darstellung der MBK-Werte zeigt Tabelle 10. Mit Hilfe eines aus dem Verhältnis von MBK-Wert des Trockensekrets zu MBK-Wert der Testbouillon gebildeten Faktors konnten die Unterschiede der MBK-Werte zwischen Trockensekret und Testbouillon abgeschätzt werden. Als Extremwerte konnten 512 und 1 ermittelt werden. Für Penicillin G wurden Faktoren zwischen 1 und 128 errechnet. Der Faktor 1 bedeutet, daß die MBK-Werte in Trockensekret und Testbouillon gleich waren. Die Faktoren für Oxacillin lagen bei drei Untersuchungen zwischen 4 und 32. Die übrigen drei Untersuchungen ergaben keine genau bestimmbaren Faktoren, da die MBK-Werte im Trockensekret oberhalb der noch letzten geprüften Wirkstoffkonzentration von 32 mcg/ml lagen. Die Faktoren lagen in einem Bereich von mindestens 32 bis mindestens 256. Für Cephalonium wurden Faktoren zwischen 8 und 512 errechnet.

3.3.7 Indirekte Bestimmung der MHK-Werte bei Trockensekreten durch Keimzählung

Im Rahmen der Ermittlung der MBK wurden stets Keimzahlbestimmungen von allen zur Verfügung stehenden Verdünnungsstufen vorgenommen. Bei Testbouillon war nach Ausstrich von jeweils 0,01 ml die Rasenbildung auf Blutagar stets mit einer Trübung des Mediums gekoppelt, während Keimzahlen < 20 000/ml in keinem Falle eine Trübung des Mediums bedingten, so daß auf diese Weise eine "indirekte" Bestimmung der MHK ermöglicht wurde, zumal, wie üblich für MBK- wie MHK-Bestimmung, der gleiche Ansatz ausgeführt wurde. Nach diesem Auswertungsmodus lagen in der Testbouillon - im Gegensatz zum Trockensekret - MBK- und MHK-Werte eng beieinander. Sie waren meist gleich, oder die MBK-Werte lagen um ein bis zwei Verdünnungsstufen höher. Die "indirekt" ermittelten MHK-Werte von Testbouillon und Trockensekret waren gleich oder differierten nur um eine Stufe nach oben oder unten (Tab.10).

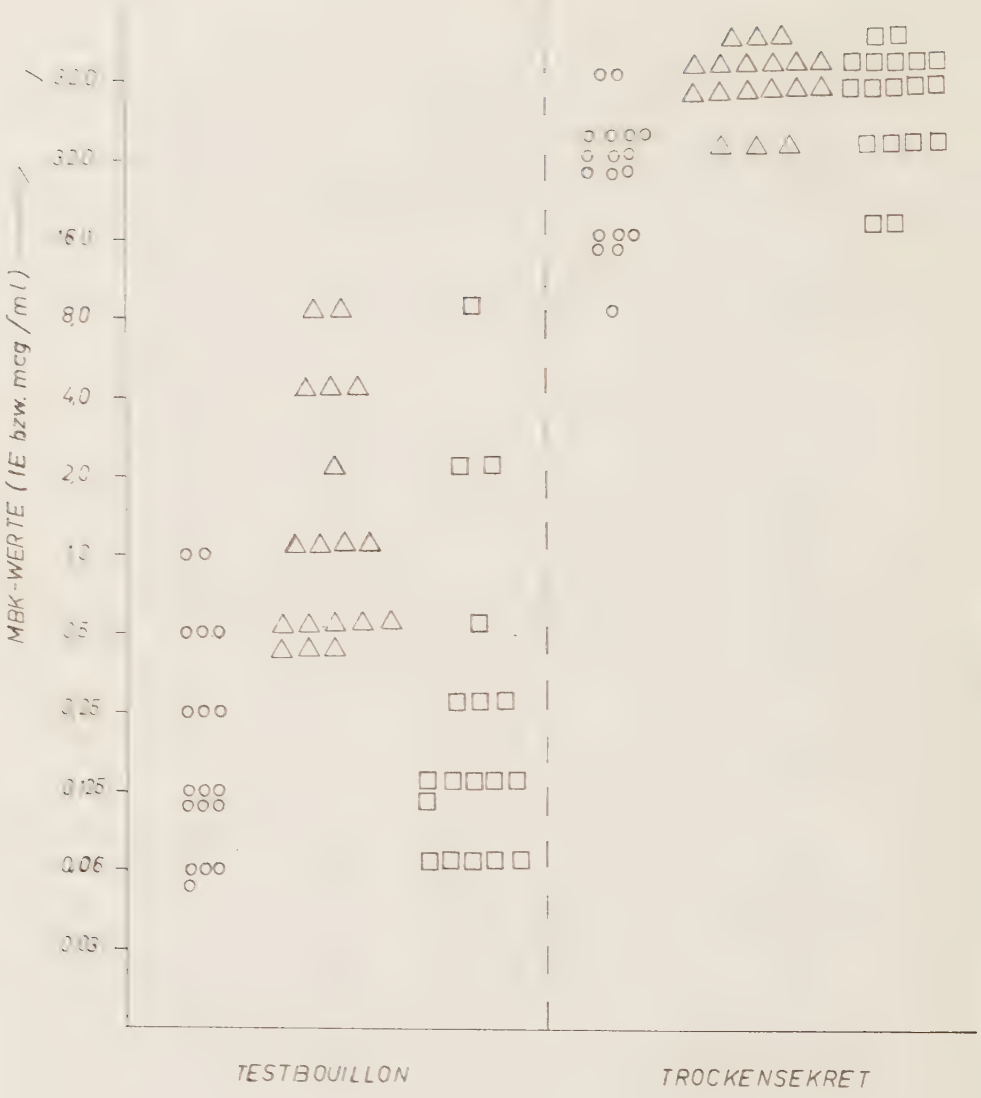

Abb. 1 ... minale bakterizide Konzentration (MBK) von Betalaktam-Antibiotika gegenüber Saureus in Trockensekret und Testbouillon (DIN-Methode

Tabelle 1

Vergleich der MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika in Trockensekret und Testbouillon

DIN - Methode

Trockensekret Nr.	Tag nach dem Trockenstellen	S.aureus-Stamm	MBK-Wert (Trockensekret): Penicillin G	MBK-Wert (Trockensekret): Oxacillin	MBK-Wert (Testbouillon) Cephalonium
Moldi B	4. Tag	145	32:0,5	>32:4	16:0,125
Moldi B	4. Tag	144	16:0,5	32: >4	16: >4
Tanne C	4. Tag	133	32:0,125	>32:0,5	>32:2
Fichtel B	5. Tag	142	32:1	>32:4	>32:0,25
Perela A	5. Tag	4	16:0,125	>32:0,5	32:0,063
Perela A	5. Tag	14	32:0,25	>32: >4	>32:0,125
866 C	5. Tag	318	16:0,125	32:0,5	>32:2
Moldi B	6. Tag	149	16:0,25	>32:4	32:0,25
Moldi B	6. Tag	148	>32:0,125	>32:1	>32:0,125
Tanne C	6. Tag	99	16:0,063	>32:0,5	>32:0,063
Tanne C	6. Tag	97	>32:0,063	>32:0,5	>32:0,063
Renate C	7. Tag	150	8:0,125	32:0,5	32:0,125
Moldi B	8. Tag	154	32:1	>32:2	>32:0,125
Perela C	8. Tag	96	32:0,125	>32:0,5	>32:0,25
Perela C	8. Tag	92	32:0,063	>32:0,5	>32:0,063
Moldi B	9. Tag	136	32:0,25	>32:1	>32:0,5
Aspasia C	9. Tag	17	32:0,063	>32:1	>32:0,125
Aspasia C	9. Tag	10	32:0,5	>32:1	32:0,063

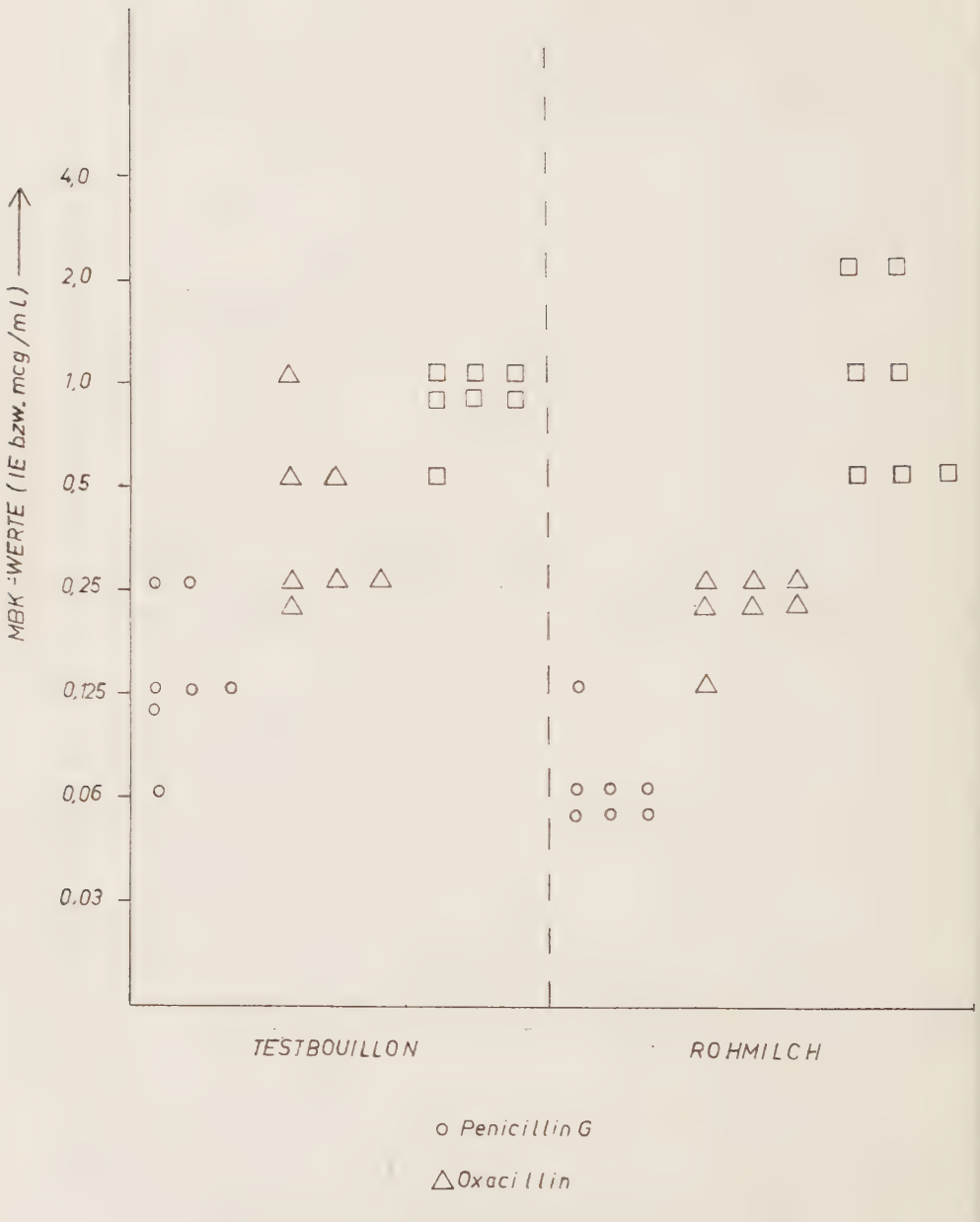

Abb. 2 : Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S. aureus in Rohmilch und Testbouillon (DIN-Methode)

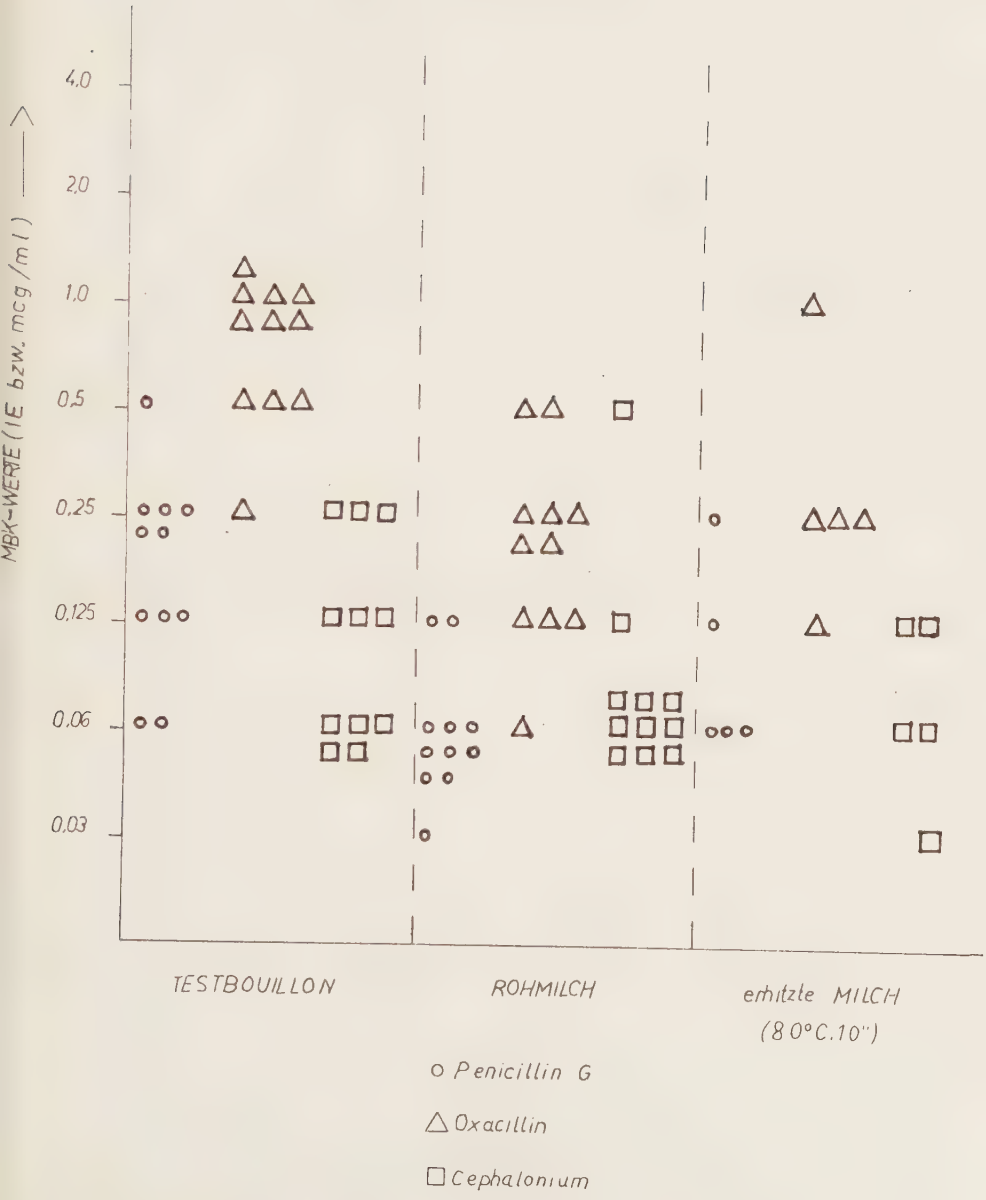

Abb. 3 : Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Betalaktam - Antibiotika gegenüber S.aureus in Milch und Testbouillon (DIN- Methode)

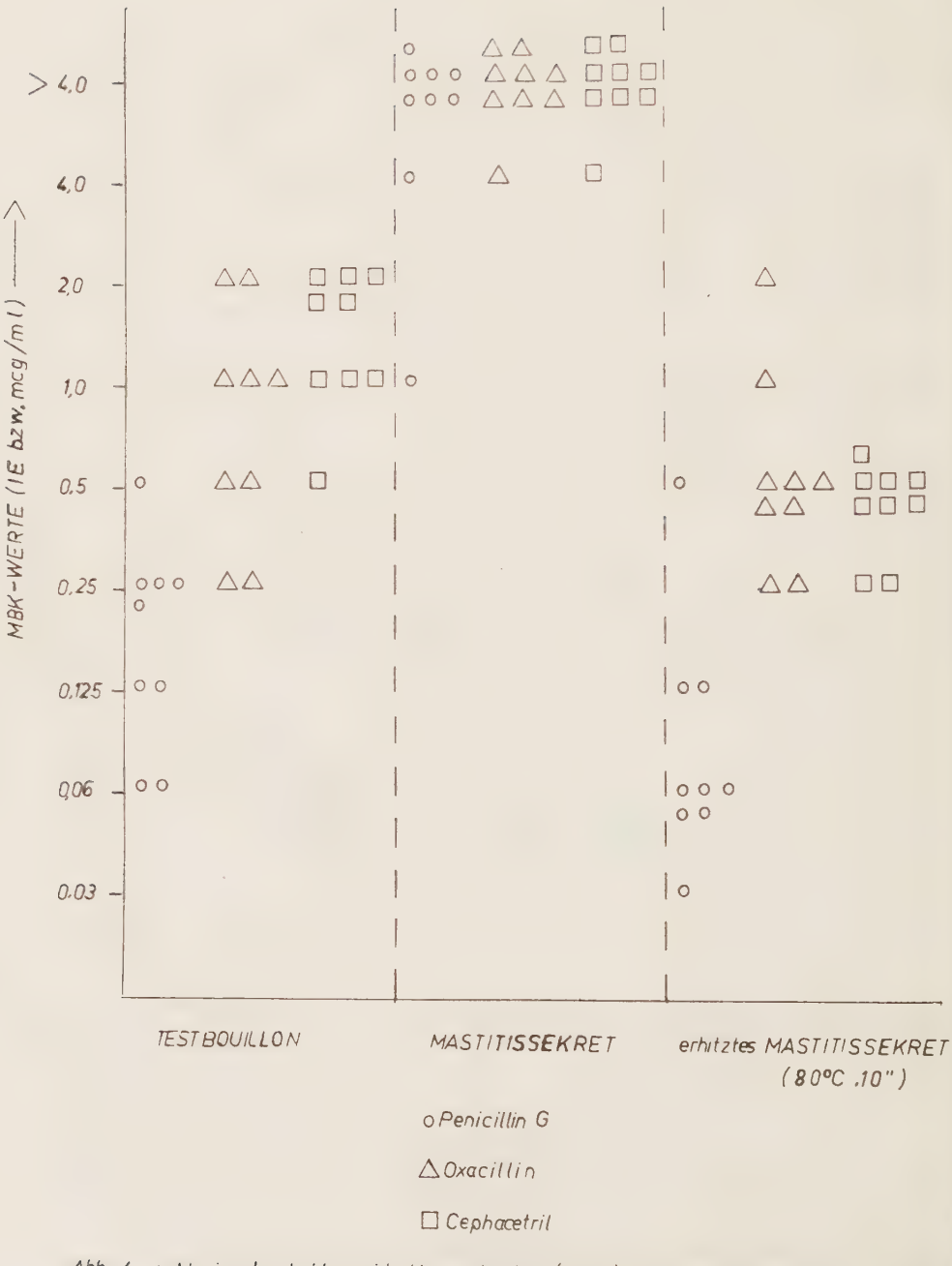

Abb. 4 : Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Betalaktam-Antibiotika gegenüber Saureus in Mastitissekret und Testbouillon (DIN-Metho

Tabelle 2

Hemmhofgrößen des Penicillin G-haltigen Trockensekrets bzw. Testmediums vor und nach Bebrütung
(Prüfung des Abbaus des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	IE/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	7. Tag	0,8	424	35,1	34,0
Testbouillon				37,6	37,0
Trockensekret	7. Tag	0,8	434	35,3	34,3
Testbouillon				37,2	36,3
Trockensekret	7. Tag	0,25	424	28,2	27,0
Testbouillon				34,3	33,3
Trockensekret	7. Tag	0,25	434	28,1	27,2
Testbouillon				33,4	31,5
Trockensekret	7. Tag	0,1	424	20,4	19,2
Testbouillon				30,0	29,2
Trockensekret	7. Tag	0,1	434	20,1	18,7
Testbouillon				29,7	29,4

Fortsetzung der Tabelle 2

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	IE/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	12. Tag	0,8	414	32,9	32,2
Testbouillon				34,5	34,1
Trockensekret	12. Tag	0,25	414	28,5	27,9
Testbouillon				31,3	30,3
Trockensekret	12. Tag	0,1	414	26,2	25,6
Testbouillon				28,9	27,8
Trockensekret	18. Tag	0,8	412	36,4	35,3
Testbouillon				37,6	37,0
Trockensekret	18. Tag	0,25	412	32,3	30,6
Testbouillon				35,9	35,1
Trockensekret	18. Tag	0,1	412	25,6	24,7
Testbouillon				27,3	26,9

Tabelle 3

Hemmhofgrößen des Oxacillin-haltigen Trockensekrets bzw. Testmediums vor und nach Bebrütung
(Prüfung des Abbaus des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	mcg/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	7. Tag	0,8	424	31,2	30,3
Testbouillon				31,2	31,0
Trockensekret	7. Tag	0,8	434	31,1	30,0
Testbouillon				32,6	31,0
Trockensekret	7. Tag	0,25	424	25,7	24,3
Testbouillon				28,1	27,6
Trockensekret	7. Tag	0,25	434	26,1	24,4
Testbouillon				28,5	28,0
Trockensekret	7. Tag	0,1	424	16,0	16,0
Testbouillon				20,9	20,4
Trockensekret	7. Tag	0,1	434	16,0	16,0
Testbouillon				21,6	20,8

Fortsetzung der Tabelle 3

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	mcg/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	12. Tag	0,8	414	29,7	29,4
Testbouillon				33,2	32,3
Trockensekret	12. Tag	0,25	414	24,1	22,2
Testbouillon				26,6	25,9
Trockensekret	12. Tag	0,1	414	18,2	16,5
Testbouillon				21,5	20,7
Trockensekret	18. Tag	0,8	412	31,6	29,5
Testbouillon				35,3	34,9
Trockensekret	18. Tag	0,25	412	25,7	22,3
Testbouillon				29,3	28,6
Trockensekret	18. Tag	0,1	412	19,5	19,0
Testbouillon				22,6	21,6

Tabelle 4

Hemmhofgrößen des Cephalonium-haltigen Trockensekrets bzw. Testmediums vor und nach Bebrütung
(Prüfung des Abbaus des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	mcg/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	7. Tag	0,8	424	31,0	28,1
Testbouillon				34,0	33,6
Trockensekret	7. Tag	0,8	434	30,6	27,0
Testbouillon				35,0	34,5
Trockensekret	7. Tag	0,25	424	26,1	23,2
Testbouillon				30,0	29,5
Trockensekret	7. Tag	0,25	434	26,0	23,7
Testbouillon				31,2	29,8
Trockensekret	7. Tag	0,1	424	20,4	19,6
Testbouillon				24,8	23,5
Trockensekret	7. Tag	0,1	434	20,1	19,1
Testbouillon				23,5	22,4

Fortsetzung der Tabelle 4

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	mcg/ml	S.aureus-Stamm	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) zu Beginn der Bebrütung	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm) nach 20 Std.-Bebrütung
Trockensekret	12. Tag	0,8	414	36,5	32,1
Testbouillon				39,3	36,5
Trockensekret	12. Tag	0,25	414	28,2	25,0
Testbouillon				29,7	28,7
Trockensekret	12. Tag	0,1	414	21,9	19,3
Testbouillon				23,8	21,5
Trockensekret	18. Tag	0,8	412	34,1	28,5
Testbouillon				39,5	38,4
Trockensekret	18. Tag	0,25	412	28,8	22,9
Testbouillon				32,0	30,6
Trockensekret	18. Tag	0,1	412	21,6	19,7
Testbouillon				26,0	24,3

Tabelle 5

Hemmhofgrößen des Penicillin G-haltigen Trockensekrets bzw.Testmediums (0,5 IE/ml) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Prüfung des mikrobiologisch aktiven Anteils des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	6. Tag	DIN	30,0
		DIREKT	37,4
Testbouillon		DIN	37,6
		DIREKT	39,2
Trockensekret	6. Tag	DIN	31,6
		DIREKT	38,5
Testbouillon		DIN	38,7
		DIREKT	39,2
Trockensekret	6. Tag	DIN	28,6
		DIREKT	34,6
Testbouillon		DIN	33,9
		DIREKT	36,6
Trockensekret	6. Tag	DIN	34,9
		DIREKT	39,4
Testbouillon		DIN	37,5
		DIREKT	41,0
Trockensekret	7. Tag	DIN	21,0
		DIREKT	34,4
Testbouillon		DIN	36,9
		DIREKT	37,9
Trockensekret	7. Tag	DIN	20,1
		DIREKT	36,1
Testbouillon		DIN	36,1
		DIREKT	37,8

Fortsetzung der Tabelle 5

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	7. Tag	DIN	17,3
		DIREKT	34,2
Testbouillon		DIN	36,1
		DIREKT	37,1
Trockensekret	8. Tag	DIN	26,9
		DIREKT	38,6
Testbouillon		DIN	36,7
		DIREKT	39,0
Trockensekret	8. Tag	DIN	30,8
		DIREKT	39,1
Testbouillon		DIN	36,4
		DIREKT	38,8
Trockensekret	8. Tag	DIN	21,1
		DIREKT	30,4
Testbouillon		DIN	33,8
		DIREKT	34,5
Trockensekret	11. Tag	DIN	36,7
		DIREKT	37,3
Testbouillon		DIN	37,8
		DIREKT	38,5
Trockensekret	13. Tag	DIN	23,8
		DIREKT	40,6
Testbouillon		DIN	38,6
		DIREKT	43,0
Trockensekret	18. Tag	DIN	29,9
		DIREKT	37,3
Testbouillon		DIN	40,3
		DIREKT	40,7

Tabelle 6

Hemmhofgrößen des Oxacillin-haltigen Trockensekrets bzw. Testmediums (0,5 mcg/ml) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Prüfung des mikrobiologisch aktiven Anteils des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	6. Tag	DIN	18,6
		DIREKT	31,6
Testbouillon		DIN	30,0
		DIREKT	32,9
Trockensekret	6. Tag	DIN	16,8
		DIREKT	31,9
Testbouillon		DIN	29,9
		DIREKT	31,6
Trockensekret	6. Tag	DIN	17,3
		DIREKT	33,5
Testbouillon		DIN	31,3
		DIREKT	34,1
Trockensekret	6. Tag	DIN	23,1
		DIREKT	33,3
Testbouillon		DIN	31,9
		DIREKT	34,0
Trockensekret	7. Tag	DIN	< 16,0
		DIREKT	24,5
Testbouillon		DIN	27,7
		DIREKT	28,7
Trockensekret	7. Tag	DIN	16,8
		DIREKT	29,5
Testbouillon		DIN	32,1
		DIREKT	33,2

Fortsetzung der Tabelle 6

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	7. Tag	DIN	16,0
		DIREKT	31,0
Testbouillon		DIN	32,0
		DIREKT	33,1
Trockensekret	8. Tag	DIN	18,6
		DIREKT	30,6
Testbouillon		DIN	31,1
		DIREKT	31,8
Trockensekret	8. Tag	DIN	30,6
		DIREKT	33,5
Testbouillon		DIN	35,4
		DIREKT	36,1
Trockensekret	8. Tag	DIN	< 16,0
		DIREKT	28,5
Testbouillon		DIN	32,6
		DIREKT	34,6
Trockensekret	11. Tag	DIN	23,6
		DIREKT	33,2
Testbouillon		DIN	31,7
		DIREKT	34,5
Trockensekret	13. Tag	DIN	< 16,0
		DIREKT	33,3
Testbouillon		DIN	33,0
		DIREKT	36,5
Trockensekret	18. Tag	DIN	16,4
		DIREKT	31,3
Testbouillon		DIN	32,4
		DIREKT	33,9

Tabelle 7

Hemmhofgrößen des Cephalonium-haltigen Trockensekrets bzw. Testmediums (0,5 mcg/ml) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Prüfung des mikrobiologisch aktiven Anteils des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	6. Tag	DIN	31,0
		DIREKT	36,5
Testbouillon		DIN	36,3
		DIREKT	38,5
Trockensekret	6. Tag	DIN	29,2
		DIREKT	36,4
Testbouillon		DIN	38,4
		DIREKT	39,2
Trockensekret	6. Tag	DIN	28,5
		DIREKT	36,2
Testbouillon		DIN	36,3
		DIREKT	37,3
Trockensekret	6. Tag	DIN	23,2
		DIREKT	37,8
Testbouillon		DIN	37,4
		DIREKT	38,7
Trockensekret	7. Tag	DIN	20,7
		DIREKT	36,3
Testbouillon		DIN	36,8
		DIREKT	38,1
Trockensekret	7. Tag	DIN	23,2
		DIREKT	30,0
Testbouillon		DIN	31,8
		DIREKT	32,4

Fortsetzung der Tabelle 7

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	7. Tag	DIN	17,1
		DIREKT	32,7
Testbouillon		DIN	32,1
		DIREKT	32,8
Trockensekret	8. Tag	DIN	33,8
		DIREKT	34,6
Testbouillon		DIN	34,7
		DIREKT	36,2
Trockensekret	8. Tag	DIN	26,5
		DIREKT	34,8
Testbouillon		DIN	35,2
		DIREKT	36,1
Trockensekret	8. Tag	DIN	21,0
		DIREKT	36,0
Testbouillon		DIN	37,7
		DIREKT	38,7
Trockensekret	11. Tag	DIN	32,6
		DIREKT	35,0
Testbouillon		DIN	32,6
		DIREKT	35,0
Trockensekret	13. Tag	DIN	18,7
		DIREKT	34,0
Testbouillon		DIN	33,0
		DIREKT	35,0
Trockensekret	18. Tag	DIN	21,0
		DIREKT	33,3
Testbouillon		DIN	33,3
		DIREKT	35,4

Tabelle 8

Hemmhofgrößen des antibiotikahalten Trockensekrets (tiefgefroren) und. Testmediums (0,5 IE bzw. mcg/ml) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Prüfung des mikrobiologisch aktiven Anteils des Antibiotikums)

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	Penicillin G	DIN	29,7
	13. Tag	DIREKT	32,7
Testbouillon		DIN	32,4
		DIREKT	33,3
Trockensekret	Penicillin G	DIN	29,1
	13. Tag	DIREKT	32,2
Testbouillon		DIN	31,8
		DIREKT	32,5
Trockensekret	Penicillin G	DIN	30,1
	13. Tag	DIREKT	33,3
Testbouillon		DIN	32,6
		DIREKT	33,4
Trockensekret	Penicillin G	DIN	30,8
	13. Tag	DIREKT	32,2
Testbouillon		DIN	31,8
		DIREKT	32,7
Trockensekret	Oxacillin	DIN	26,7
	13. Tag	DIREKT	30,5
Testbouillon		DIN	29,8
		DIREKT	31,4
Trockensekret	Oxacillin	DIN	26,5
	13. Tag	DIREKT	30,1
Testbouillon		DIN	29,9
		DIREKT	30,8

Fortsetzung der Tabelle 8

Medium	Tag nach dem Trockenstellen	Verdünnungs-Methode	Durchschnittliche Hemmhofgröße (mm)
Trockensekret	Oxacillin	DIN	27,8
	13. Tag	DIREKT	30,2
Testbouillon		DIN	29,8
		DIREKT	30,4
Trockensekret	Oxacillin	DIN	25,3
	13. Tag	DIREKT	29,7
Testbouillon		DIN	29,7
		DIREKT	30,5
Trockensekret	Cephalonium	DIN	33,5
	13. Tag	DIREKT	35,9
Testbouillon		DIN	34,6
		DIREKT	36,3
Trockensekret	Cephalonium	DIN	34,5
	13. Tag	DIREKT	36,4
Testbouillon		DIN	36,0
		DIREKT	38,7
Trockensekret	Cephalonium	DIN	35,2
	13. Tag	DIREKT	37,7
Testbouillon		DIN	35,9
		DIREKT	38,0
Trockensekret	Cephalonium	DIN	31,6
	13. Tag	DIREKT	36,3
Testbouillon		DIN	37,7
		DIREKT	38,8

Tabelle 9

Mikrobiologische Aktivität von Betalaktam-Antibiotika im Trockensekret nach unterschiedlicher Vorbehandlung (DIN- und Direkt-Methode)

Trockensekret Nr.	Tag nach dem Trockenstellen	Antibiotikum	Mikrobiologische Aktivität (IE bzw. mcg/ml) Direktmethode (a) und DIN-Methode (b)	
			a)	b)
89 C	6. Tag	Penicillin G	0,5	0,16
71 B	6. Tag	Penicillin G	0,5	0,28
975 C + D	7. Tag	Penicillin G	0,5	0,05
36 D	7. Tag	Penicillin G	0,5	0,04
32 A	7. Tag	Penicillin G	0,5	0,01
975 A + B	8. Tag	Penicillin G	0,5	0,09
24 A + B	18. Tag	Penicillin G	0,5	0,14
89 C	6. Tag	Oxacillin	0,5	0,13
71 B	6. Tag	Oxacillin	0,5	0,2
67 B	11. Tag	Oxacillin	0,5	0,24
24 A + B	18. Tag	Oxacillin	0,5	0,22
89 C	6. Tag	Cephalonium	0,5	0,48
71 B	6. Tag	Cephalonium	0,5	0,12
36 D	7. Tag	Cephalonium	0,5	0,16
975 A + B	8. Tag	Cephalonium	0,5	0,08
24 B	13. Tag	Cephalonium	0,5	0,06
24 A + B	18. Tag	Cephalonium	0,5	0,08

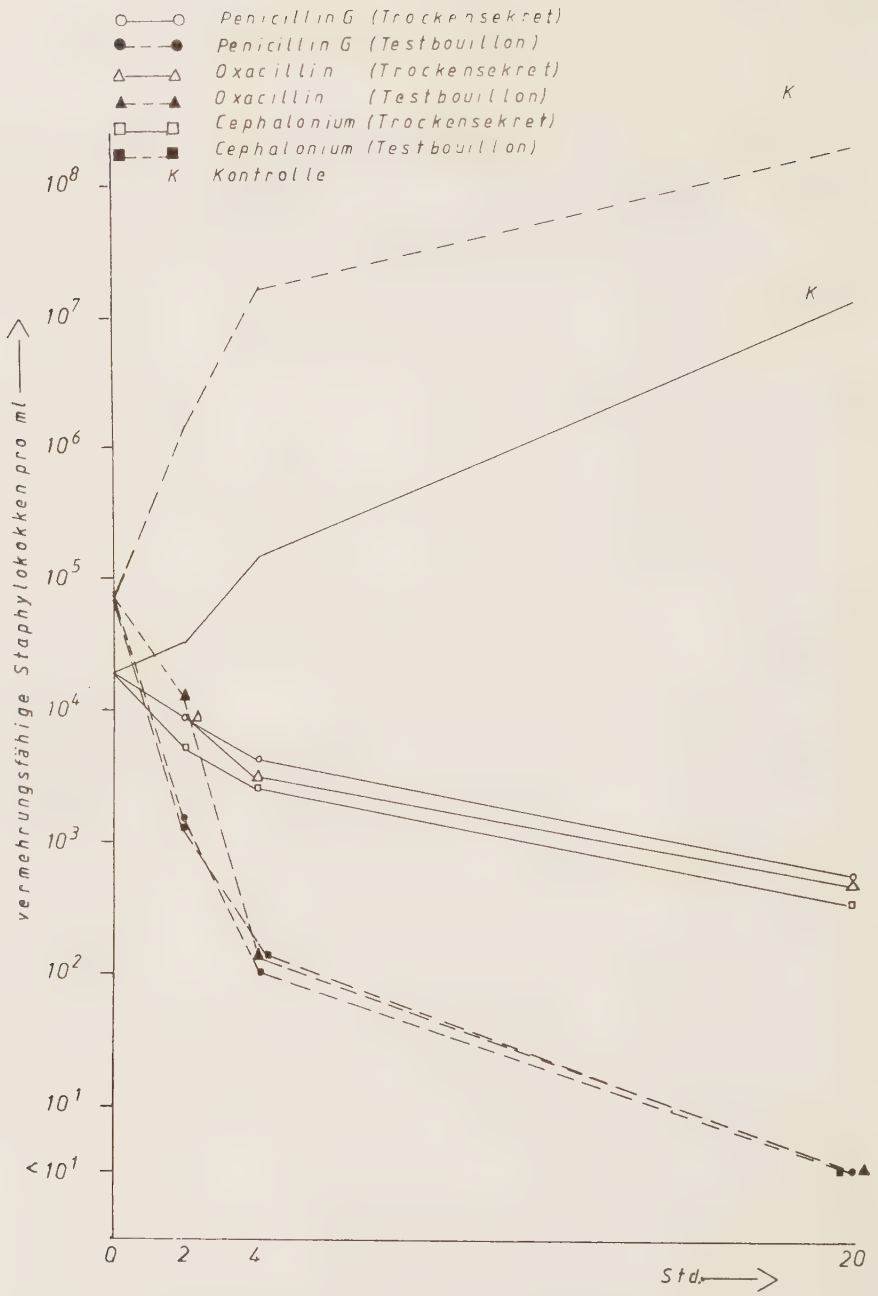

Abb. 5 : Abtötungskurven von S. aureus 426 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

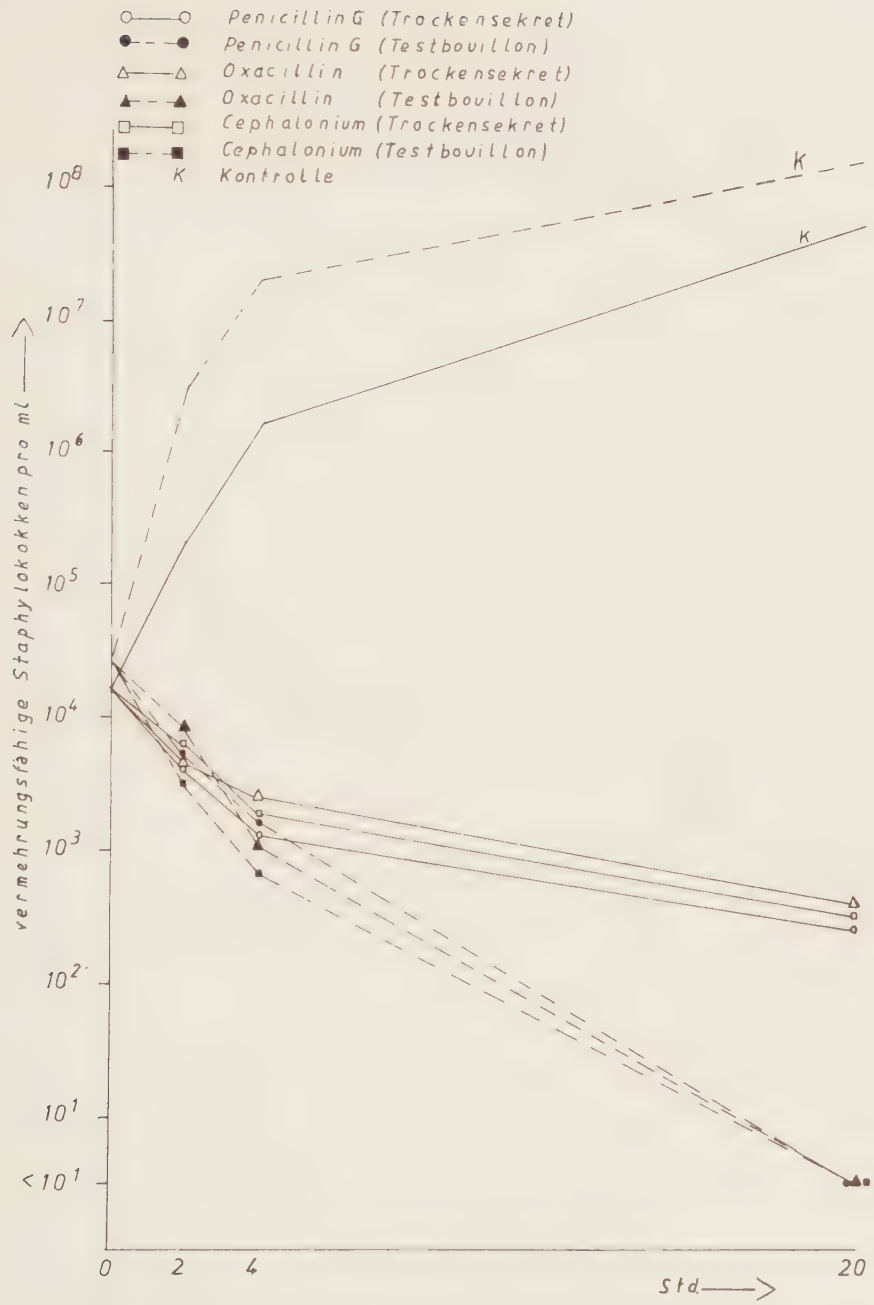

Abb. 6 : Abtötungskurven von S. aureus 432 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

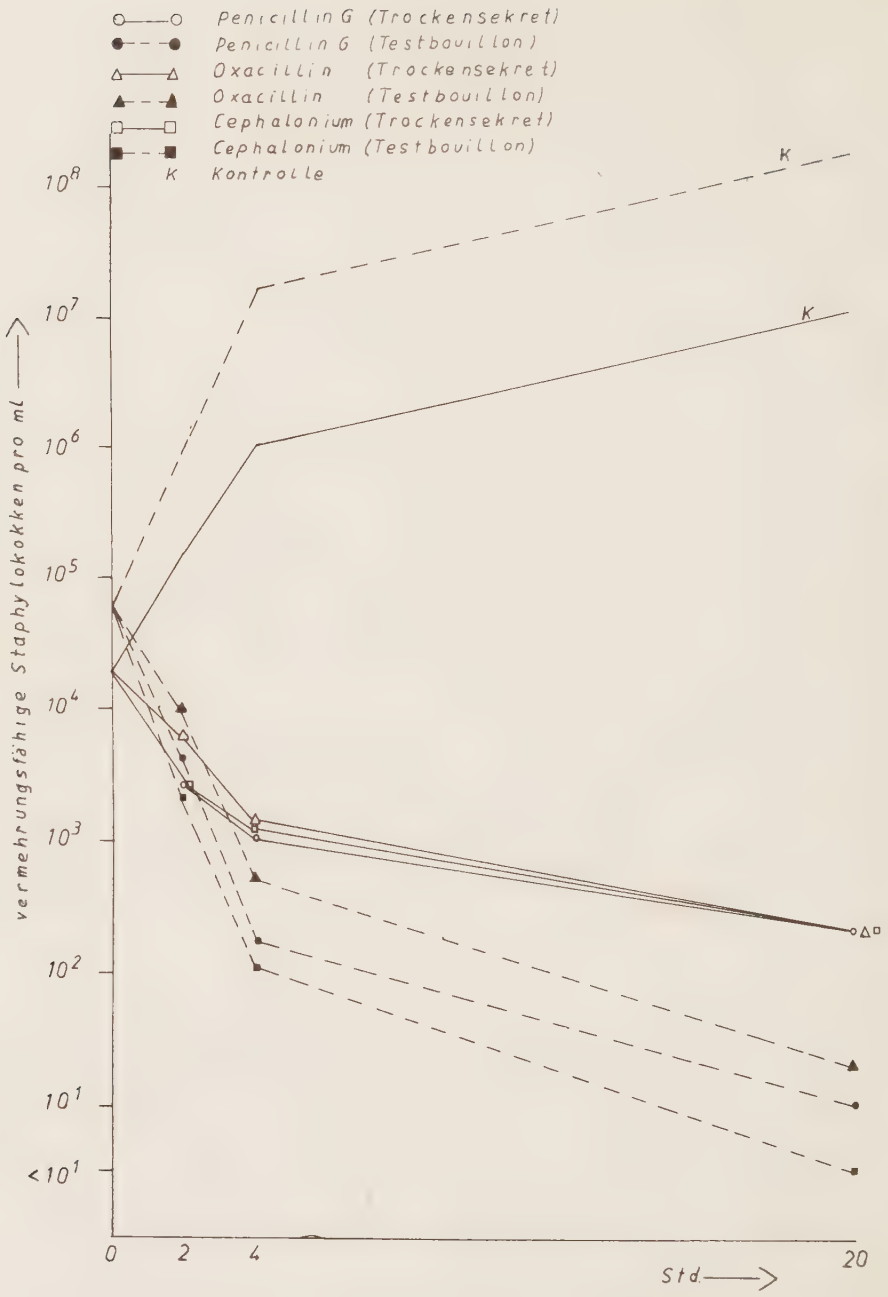

Abb. 7 : Abtötungskurven von S. aureus 433 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

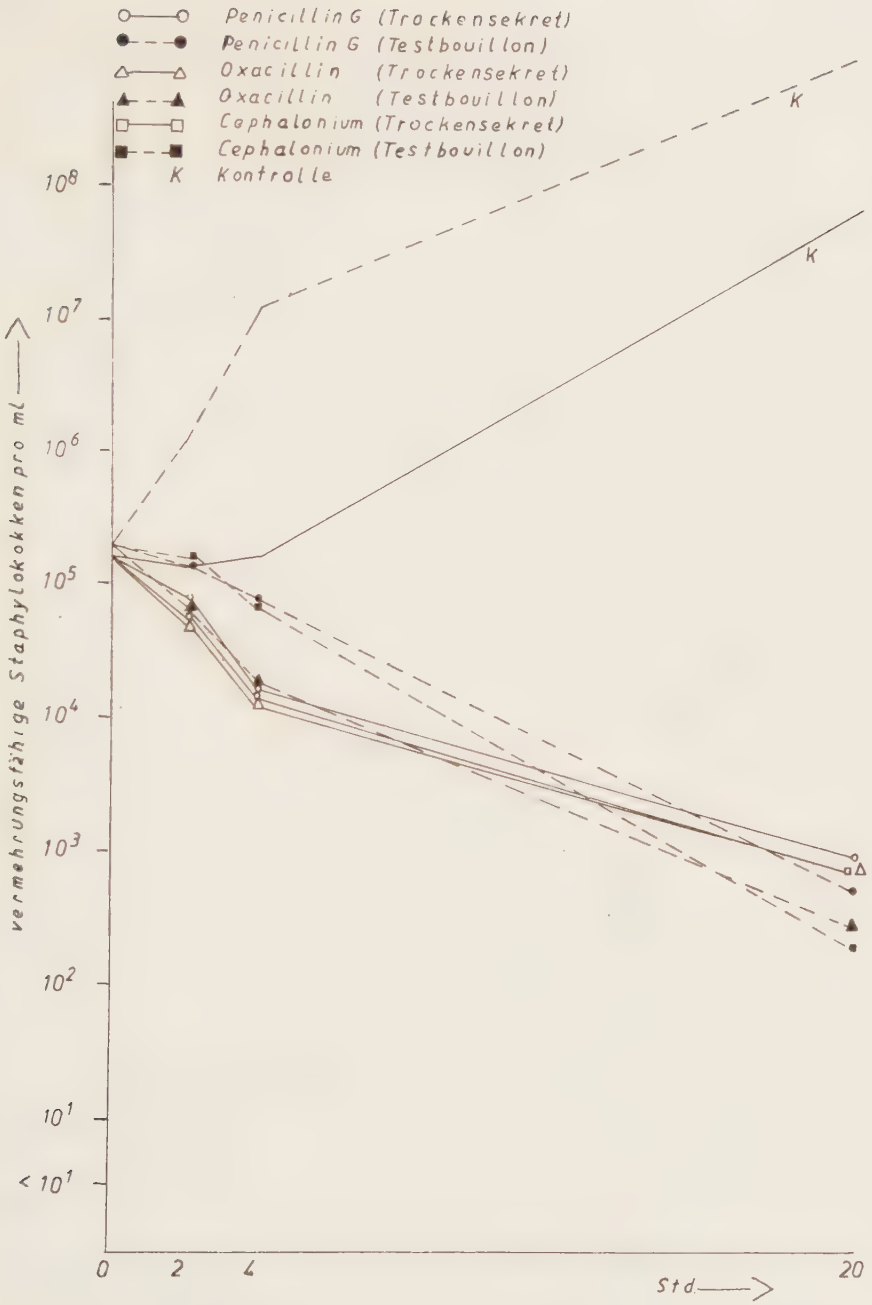

Abb. 8 : Abtötungskurven von S. aureus 431 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw. mcg/ml)

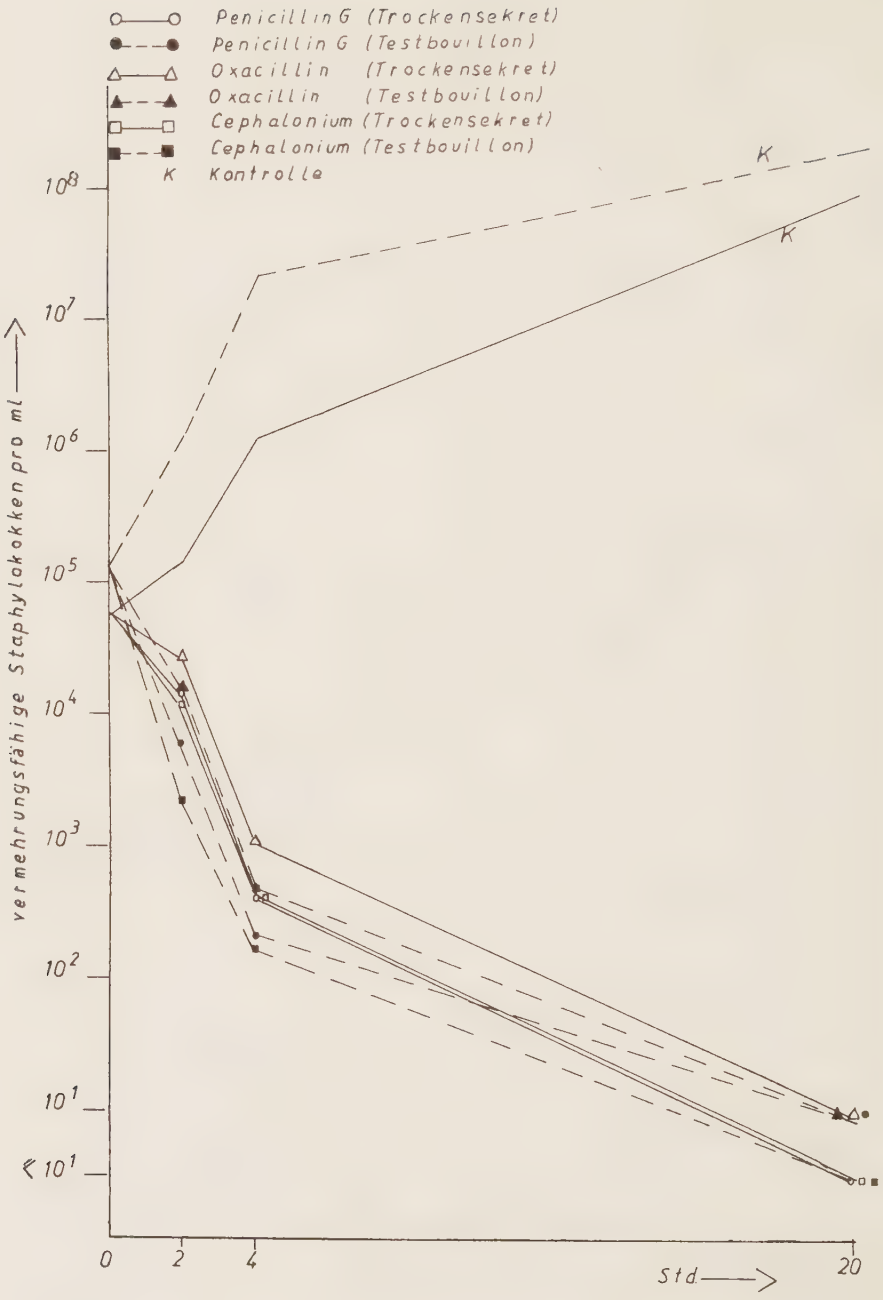

Abb. 9 : Abtötungskurven von S. aureus 425 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

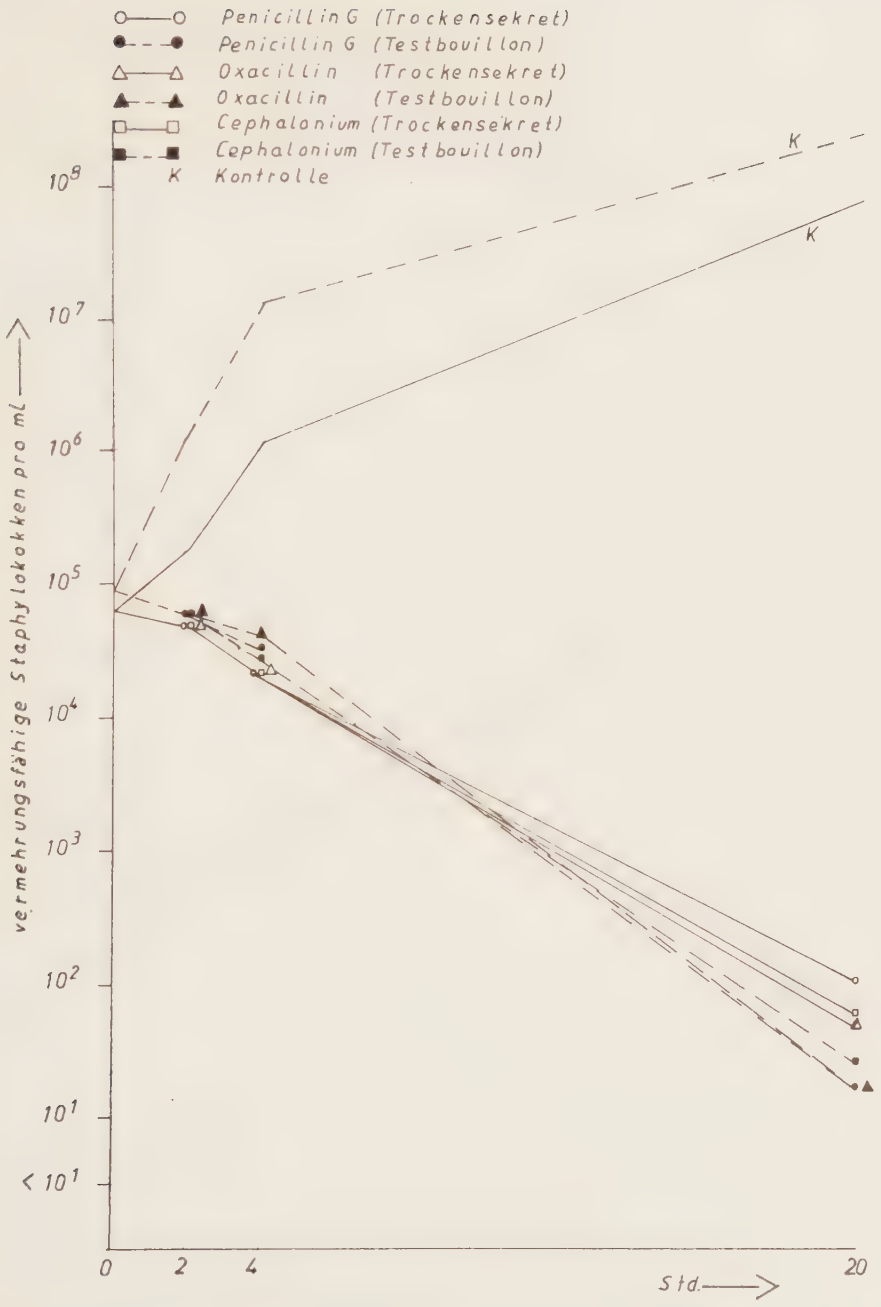

Abb. 10 : Abtötungskurven von S. aureus 428 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika (4 IE bzw mcg/ml)

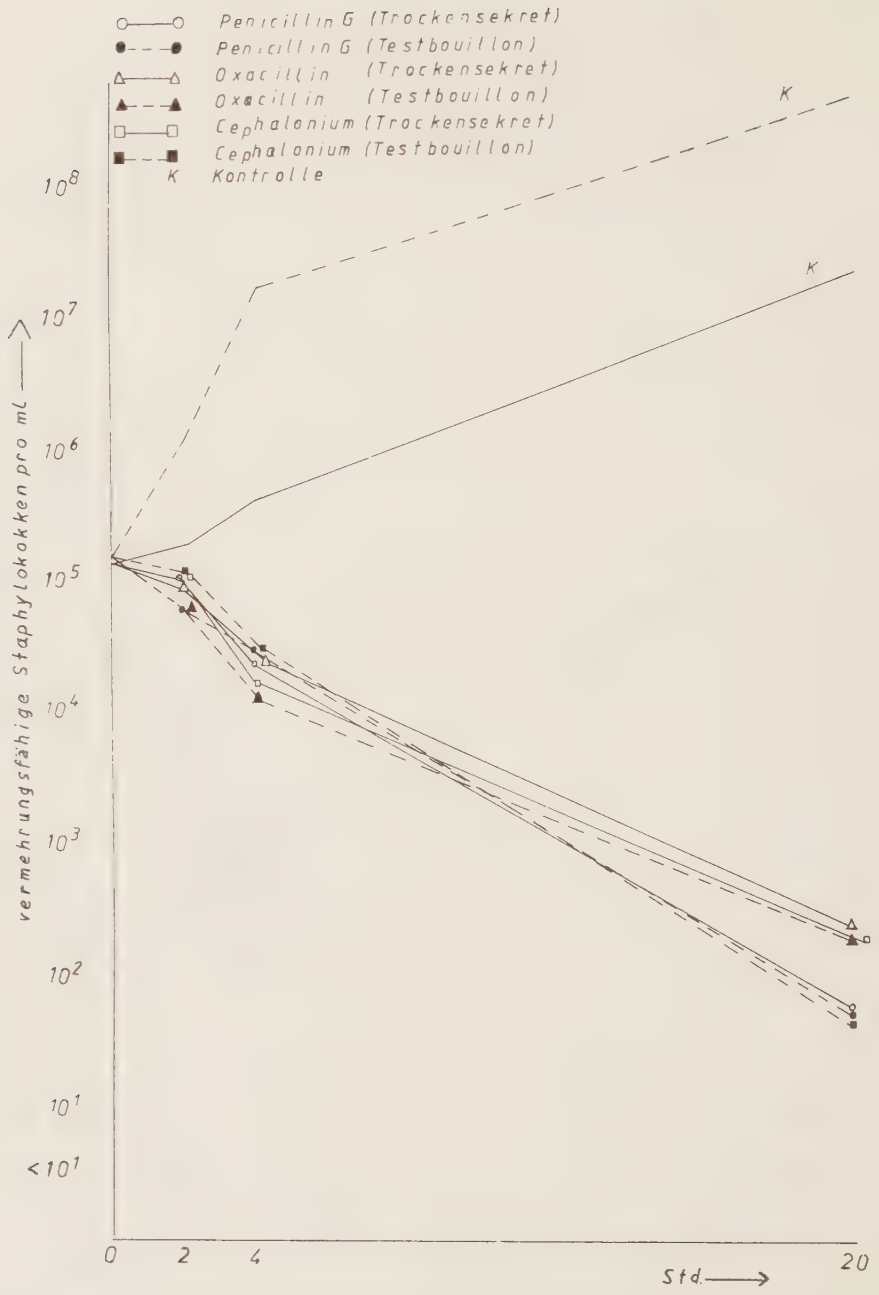

Abb. 11 : Abtötungskurven von S. aureus 429 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

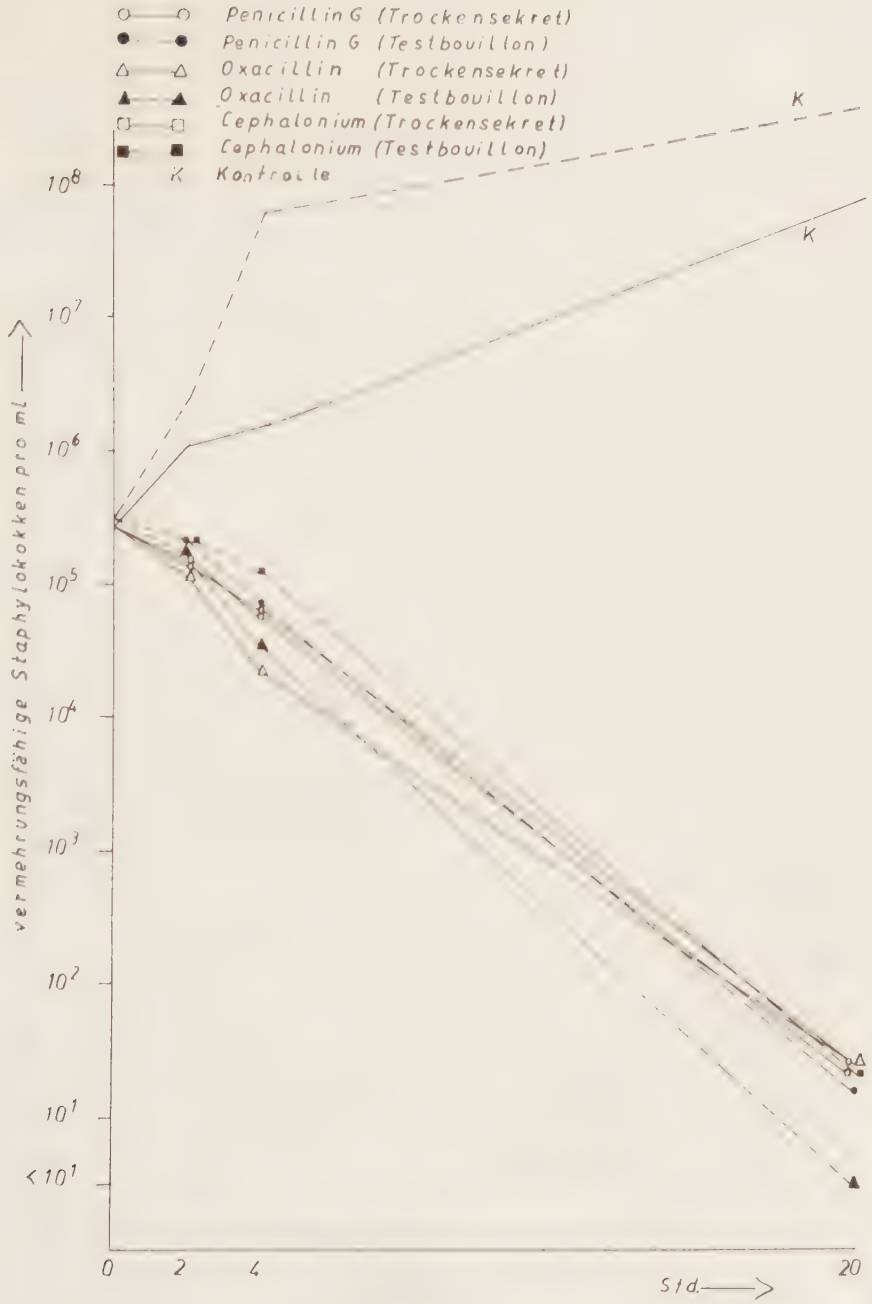

Abb. 12 : Abtötungskurven von S. aureus 430 in Trockensekret und Testbouillon nach Einwirkung von Betalaktam-Antibiotika

(4 IE bzw mcg/ml)

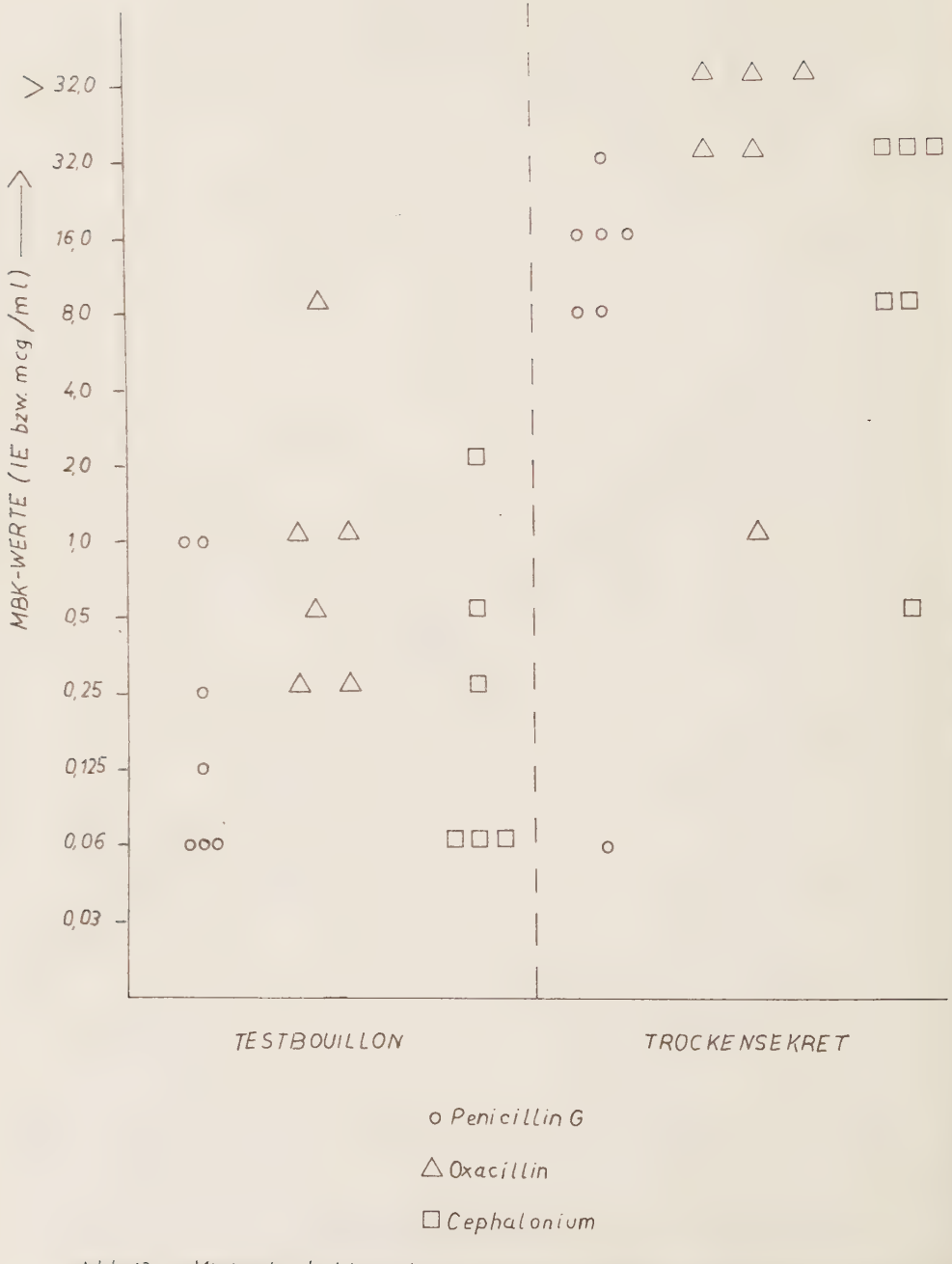

Abb. 13 : Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Betalaktam-Antibiotika gegenüber S.aureus in Trockensekret und Testbouillon (Direkt-Metho

Tabelle 10

Vergleich der MBK-Werte von Betalaktam-Antibiotika in Trockensekret und Testbouillon

Trockensekret-Nr. / Tag nach dem Trockenstellen	S.aureus-Stamm	MBK-Wert (Trockensekret): MBK-Wert (Testbouillon)					
		Penicillin G		Oxacillin		Cephalonium	
40 A / 4.	440	0,06:0,06	0*				
772 C / 4.	440			1:0,25	0*	0,25:0,06	0*
905 C / 5.	441	8:0,06	0*	32:0,5	+1*		
772 B / 5.	441					32:0,06	0*
905 C / 5.	442	8:0,06	0*				
772 B / 5.	442			32:0,25	0*	32:0,06	0*
40 D / 6.	443	16:0,5	0*				
772 C / 6.	443			>32:0,5	-1*	32:1	0*
40 C / 6.	444	16:0,125	0*	>32:0,25	+1*		
772 C / 6.	444					8:0,06	0*
40 A / 7.	447	16:0,125	-1*				
40 C / 7.	447			>32:1	-1*		
772 C / 7.	447					8:0,25	-1*
40 A / 7.	450	8:0,06	0*				

0*=MHK in beiden Medien gleich

+1*=MHK im Trockensekret um eine Stufe höher

-1*=MHK im Trockensekret um eine Stufe niedriger

4. DISKUSSION

MHK- und MBK-Bestimmungen eines Antibiotikums gegenüber Krankheitserregern stellen die sichersten Parameter zur Beurteilung der in vitro-Wirkungsintensität dar. Sowohl die Festlegung einer Antibiotika-Resistenz als auch die Bestimmung der für die Therapie erforderlichen Mindesthöhe der Antibiotika-Spiegel werden mit Hilfe der MHK festgelegt. Grundsätzlich werden diese Aktivitätsbestimmungen in künstlichen, auf Peptonbasis hergestellten Nährmedien durchgeführt. Es erscheint aber wichtig, die Wirkungsintensität der Antibiotika auch in Körperflüssigkeiten zu testen, soweit sie von therapeutischem Interesse sind. Vereinzelt sind im veterinär- und humanmedizinischen Schrifttum entsprechende Berichte zu finden. So wurden MHK- und MBK-Bestimmungen verschiedener Antibiotika in Testbouillon mit Casein-Zusatz, in Magermilch, Rohmilch und Mastitissekret durchgeführt und teilweise beachtliche Beeinträchtigungen der Antibiotika-Wirkung durch die betreffenden Medien festgestellt (AYNSLEY und HUGHES, 1954; PRICE et al., 1955/56, 1957/58; SHAHIDI und MARSHALL, 1968; ZIV, 1971 und andere). Das Trockensekret wurde dabei nicht entsprechend berücksichtigt, obwohl Antibiotika zur Mastitisprophylaxe und -therapie in der Trockenzeit umfangreich eingesetzt werden. HELM (1977) führte MHK-Bestimmungen einer Reihe von Antibiotika in verschiedenen Körperflüssigkeiten von Menschen mit dem Ergebnis durch, daß zwischen der Aktivität in Körperflüssigkeiten und in Testbouillon teilweise erhebliche Unterschiede bestanden.

Die eigenen Untersuchungen stellen eine vergleichende Prüfung der in vitro-Wirkungsintensität von drei Betalaktam-Antibiotika gegenüber verschiedenen euterpathogenen S.aureus-Stämmen in Trockensekret vom Rind und in Testbouillon dar. Herkömmliche MHK-Bestimmungen im Trockensekret konnten jedoch nicht vorgenommen werden, da die Beschaffenheit des Sekrets die Erkennung von Trübungen nicht zuläßt. Deshalb wurde die Bestimmung der minimalen

bakteriziden Konzentration (MBK) durchgeführt, da die bakterizid wirkenden Antibiotika, wie die Betalaktam-Antibiotika, in den MHK- und MBK-Werten bekanntlich eng beieinanderliegen. Außerdem erfolgte eine "indirekte" MHK-Bestimmung durch Zählung der Testkeime in den einzelnen Verdünnungsstufen.

Betalaktam-Antibiotika werden zur antibiotischen Versorgung der Rindereuter umfangreich eingesetzt (SMITH et al., 1967; CURTIS et al., 1977). Es erscheint von erheblichem Interesse zu erfahren, ob die Bakterizidie der drei geprüften Antibiotika Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium durch das Trockensekret gefördert wird, gleich bleibt oder gar gemindert wird, wenn man als Vergleichsmethode die herkömmliche MBK-Bestimmung heranzieht. Um nun den Praxisbedingungen möglichst nahezukommen, erschien es wichtig, die Trockensekretproben unmittelbar vor der Testung zu entnehmen und nur frisch isolierte euterpathogene S.aureus-Stämme einzusetzen.

Es ist international üblich, als Grundlage der MBK-Bestimmung die für die MHK-Bestimmung notwendige Verdünnungsreihe heranzuziehen (WICK und BONIECE, 1965; BARRY und SABATH, 1974 und SCHEER, 1976). Bei den eigenen Untersuchungen erwies es sich als Vorteil, diese grundlegende Technik nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976) durchzuführen. Die zweite Phase der MBK-Bestimmung, die eigentliche Ermittlung der Absterberate der Bakterien durch Ausstrich des flüssigen Testmediums auf feste Nährböden und durch zahlenmäßige Beurteilung des Abtötungseffektes konnte jedoch nicht ähnlich standardisiert ablaufen. Dieser zweite Teil der MBK-Bestimmung wird unterschiedlich gehandhabt, so daß die von den einzelnen Untersuchern ermittelten MBK-Werte mitunter gar nicht vergleichbar sind (MÖSSNER et al., 1969; ZIV et al., 1973b und KLASTERKY et al., 1974). Das zur Beurteilung des Abtötungseffektes ausgestrichene Volumen des Testmediums schwankte zwischen 0,1 ml und 0,005 ml (BARRY und SABATH, 1974 und APPLESTEIN et al.,

1968). Zur Bestimmung der niedrigsten Wirkstoffkonzentration, die notwendig ist, um die Testkeime abzutöten, wurde im Extremfall vom Ausbleiben jeglichen Koloniewachstums oder vom Wachstum von weniger als vier Kolonien ausgegangen (SHAHIDI und MARSHALL, 1968 und ZIV et al., 1973b).

Die unter Heranziehung der "DIN-Methode" durchgeführten MBK-Bestimmungen der drei Betalaktam-Antibiotika ergaben, daß die MBK-Werte im Trockensekret stets höher lagen als in der Testbouillon (arithmetisches Mittel der Unterschiede in den MBK-Verdünnungsstufen für Penicillin G 6,8). Das Trockensekret förderte in keinem Fall die Bakterizidie der geprüften Antibiotika, sondern hemmte sie beachtlich, wenn man die Standardmethode zum Vergleich heranzieht. Eine Diskussion dieser Ergebnisse im Rahmen der einschlägigen Literatur ist nicht möglich, da keine entsprechenden Publikationen vorlagen. Lediglich ZIV et al. (1973b) bestimmten in einigen wenigen Fällen die MBK-Werte von Penicillin G gegenüber S.aureus-Stämmen in steriler Milch und Trockensekret mit dem Ergebnis, daß die MBK-Werte gleich groß waren. Jedoch wurden keine vergleichenden Untersuchungen zwischen Trockensekret und Testbouillon (Standardmethode) angestellt, so daß dieser Befund mit den eigenen Ergebnissen nicht direkt verglichen werden kann.

Zu Vergleichszwecken wurden auch MBK-Bestimmungen in Rohmilch, erhitzter Milch und in erhitztem und nicht erhitztem Mastitissekret vorgenommen. Die MBK-Werte von Penicillin G, Oxacillin, Cephalonium und Cephacetril lagen in Rohmilch und in erhitzter Milch gleich hoch oder sogar niedriger im Vergleich zur Testbouillon. Die hier beobachtete im Vergleich zur Standardmethode gleiche oder sogar verstärkte Wirkungsintensität steht im Widerspruch zu einigen in der Literatur angegebenen Resultaten, die einen Wirkungsverlust durch Rohmilch und durch erhitzte Milch anzeigen (PRICE et al., 1955/56; 1957/58; SHAHIDI und MARSHALL, 1968 und KHAN und MARSHALL, 1969). Dagegen

beobachteten DEUBLER und COLE (1955), SHAHIDI und MARSHALL (1968) und ZIV (1971) in nicht erhitztem Mastitissekret ebenfalls Verluste der Wirkungsintensität von Antibiotika im Vergleich zur Standardmethode.

Um die großen Unterschiede im Niveau der MBK-Werte in Trockensekret und Testbouillon zu klären, wurde zunächst geprüft, ob ein unterschiedlicher Abbau des Antibiotikums während der 14 - 18stündigen Bebrütung in den beiden Medien vorlag. Der Abbau der Antibiotika war in beiden Medien jedoch geringgradig und verlief vor allem bei beiden Medien in annähernd gleichem Umfang, so daß dieser Befund keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede der MBK-Werte sein konnte. Die Untersuchungen über den mikrobiologisch aktiven Anteil des Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon hingegen erbrachten interessante Aufschlüsse. Der Gehalt des Trockensekrets an Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium wurde wesentlich von der Verdünnungsmethode bestimmt. Bis zu 50fach geringere Antibiotika-Gehalte wurden in dem nach der DIN-Methode behandelten Trockensekret gefunden. Es zeigte sich, daß bei der nach der "DIN-Methode" angelegten Verdünnungsreihe in der Testbouillon wesentlich mehr mikrobiologisch aktives Antibiotikum vorlag als im Trockensekret, während bei der "Alternativ-Methode" diese Unterschiede nicht auftraten. Hieraus wird klar ersichtlich, daß die Verdünnungsreihe nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 (FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN, 1976) nicht als Grundlage für die MBK-Bestimmung der geprüften Antibiotika in einem so eiweißreichen Medium wie dem Trockensekret in Frage kommt. Eine Alternative ist zweifellos die beschriebene "direkte" Methode, die derartig große Unterschiede der mikrobiologischen Aktivität in den beiden Medien bei gleicher Dosis des Antibiotikums verhindert. Möglicherweise beruhen die beobachteten Unterschiede an mikrobiologisch verfügbarem Antibiotikum in Trockensekret und Testbouillon auf der Bindung der Betalaktam-Antibiotika an Eiweißkomponenten des Trockensekrets, die sich bei dem Verdünnungsschema des Norm-Entwurfs besonders auswirkt.

In der Trockenperiode kommt es zu einem Anstieg des Gesamtproteins des Eutersekrets, insbesondere des Albumins (SMITH et al., 1967; ZIV und GORDIN, 1973). Auch HELM (1977) machte Beobachtungen, wonach eiweißreiche Medien (Ascites, Pleuraexsudat und Ovarialcystenflüssigkeit) zu einem geringen Wirkungsverlust des Penicillins führten.

Da die "DIN-Methode" zur Bestimmung der MBK im Trockensekret nicht brauchbar war, mußten neue MBK-Bestimmungen in Trockensekret und Testbouillon nach der "Direkt-Methode" durchgeführt werden mit dem Ergebnis, daß die MBK-Werte von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium wiederum höher, allerdings nicht in dem vorher beobachteten Umfang, lagen (arithmetisches Mittel der Unterschiede in den MBK-Verdünnungsstufen für Penicillin G 5,7 und Cephalonium 6,2).

Die Abtötungskurven der drei in Trockensekret und Testbouillon vergleichend geprüften Antibiotika waren dadurch charakterisiert, daß alle getesteten S.aureus-Stämme im Trockensekret (ohne Wirkstoffzusatz) unmittelbar nach der Einsaat bei gleicher Einsaatgröße niedrigere Keimzahlen hatten und sich in diesem Medium auch schlechter vermehrten, während sie im Trockensekret mit Zusatz von Antibiotikum höhere Überlebensraten zeigten.

Im Rahmen der Ermittlung der MBK wurden stets Keimzahlbestimmungen von allen zur Verfügung stehenden Verdünnungsstufen vorgenommen. Bei Testbouillon war nach Ausstrich von jeweils 0,01 ml die Rasenbildung auf Blutagar stets mit einer Trübung des Mediums gekoppelt, während Keimzahlen $< 20\,000$/ml in keinem Falle eine Trübung des Mediums bedingten, so daß auf diese Weise eine "indirekte" Bestimmung der MHK ermöglicht wurde, zumal wie üblich für MBK- wie MHK-Bestimmung der gleiche Ansatz ausgeführt wurde. Nach diesem Auswertungsmodus lagen in der Testbouillon - im Gegensatz zum Trockensekret - MBK- und MHK-Werte eng beieinander. Sie waren meist gleich oder die MBK-Werte

lagen um ein bis zwei Verdünnungsstufen höher. Die "indirekt" ermittelten MHK-Werte von Testbouillon und Trokkensekret waren gleich oder differierten nur um eine Stufe nach oben oder unten (Tab. 10). Als charakteristisch für das Trockensekret zeigte sich, daß die auf die Verdünnungsstufen mit Rasenbildung folgenden höheren Antibiotika-Konzentrationen nie > 20 000 Keime/ml, sondern relativ niedrige Keimzahlen im Bereich von 7 000 bis 300 aufwiesen.

Es überrascht, daß die Bakterizidie im Trockensekret deutlich schwächer ausgeprägt war als in der Testbouillon, wie die MBK-Werte eindeutig belegt haben. Obwohl übereinstimmend davon ausgegangen wird, daß das Trockensekret über beachtliche antibakterielle Faktoren verfügt (REITER und BRAMLEY, 1975; WELTY et al., 1976) und außerdem die Abtötungskurven eine schwächere Vermehrung der Testkeime im Trockensekret ohne Wirkstoffzusatz zeigten.

Im Zusammenhang mit der Festlegung therapeutischer Mindestspiegel dürfte den Bakterizidie-Befunden eine zweitrangige Bedeutung zukommen, da bisher die MHK-Werte als maßgebend anerkannt sind. Die MHK-Werte konnten in dieser Studie anhand der Keimzahlbestimmung aller zur Verfügung stehender Verdünnungsstufen "indirekt" ermittelt werden, wobei auffällig war, daß MHK- und MBK-Werte bei der Testbouillon erwartungsgemäß eng beieinanderlagen, während beim Trokkensekret erhebliche Unterschiede bestanden. Durch MBK-Bestimmung die Lage der MHK annähernd zu erkennen, war nur bei Testbouillon nicht aber bei Trockensekret realisierbar. Die MHK-Bestimmung im Trockensekret durch Auszählung der vermehrungsfähigen Testkeime muß als ausreichend sicher bezeichnet werden, da bei den eigenen Untersuchungen entweder $> 1 \times 10^6$ Testkeime/ml oder < 20 000 Keimen/ml bzw. kein Wachstum registriert wurden. Es ist davon auszugehen, daß $> 1 \times 10^6$ Staphylokokken/ml in klaren Flüssigkeiten eine mit dem bloßen Auge wahrnehmbare Trübung bedingen, während < 20 000 Staphylokokken/ml sicher zu keiner entsprechenden Trübung führen (KLEIN, 1957).

Die Untersuchungen erlauben den Schluß, daß im Hinblick auf Festlegung therapeutischer Mindestspiegel in Testbouillon ermittelte MHK-Werte von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium gegenüber S.aureus auf das Trockensekret der frühen Trockenzeit übertragbar sind, auch wenn überraschenderweise eine Bakterizidie-Abschwächung im antibiotikumhaltigen Trockensekret vorlag.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Vergleichende Bestimmungen der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium gegenüber Penicillinase-negativen S.aureus-Stämmen in frisch entnommenem Trockensekret und in Testbouillon (DIN-Methode) ergaben, daß die MBK-Werte im Trockensekret wesentlich höher lagen als in der Testbouillon (arithmetisches Mittel der Unterschiede in den MBK-Verdünnungsstufen für Penicillin G 6,8).

   Im Vergleich zur Standardmethode mit Bouillon traten Erhöhungen der MBK-Werte bei Testungen von roher und erhitzter Milch und von erhitztem Mastitissekret - im Gegensatz zu unerhitztem Mastitissekret - nicht auf.

2. Während des Bebrütungszeitraumes kam es zu keinem nennenswerten Abfall der mikrobiologischen Aktivität des einzelnen Antibiotikums in Trockensekret und Testbouillon, so daß mit diesem Befund das unterschiedliche Niveau der MBK-Werte nicht zu erklären ist. Erhebliche Unterschiede im mikrobiologisch aktiven Gehalt des Antibiotikums in Trockensekret einerseits und in Testbouillon andererseits traten in Abhängigkeit davon auf, ob die Verdünnungsreihe nach dem Norm-Entwurf DIN 58940 oder nach einer alternativen Methode angelegt wurde. Die "DIN-Methode" erbrachte erheblich niedrigere mikrobiologische Aktivitäten im Trokkensekret im Vergleich zu Testbouillon als die alternative Methode und ist deshalb zur MBK-Bestimmung bei Verwendung von Trockensekreten ungeeignet.

3. Es wurden die MBK-Werte von Penicillin G, Oxacillin und Cephalonium gegenüber verschiedenen S.aureus-Stämmen in Trockensekretproben und in Testbouillon unter Einsatz der Alternativ-Methode für die Verdünnungsreihe bestimmt. Auch unter diesen verbesserten Versuchsbedingungen lagen die MBK-Werte im Trockensekret höher als in der Testbouillon (arithmetisches Mittel der Unterschiede in den MBK-Verdünnungsstufen für Penicillin G 5,7 und für Cephalonium 6,2).

4. Die vergleichende Prüfung der Bakterizidie-Kinetik in beiden Medien ergab eine schlechtere Vermehrung der Testkeime in Trockensekret ohne Zusatz von Antibiotikum, aber höhere Überlebensraten in diesem Medium mit Zusatz von Antibiotikum.

5. Durch Keimzahlbestimmung der Verdünnungsreihen konnte indirekt ermittelt werden, daß die MHK-Werte der drei Antibiotika in beiden Medien meist gleich lagen oder lediglich um eine Stufe differierten. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die herkömmliche MHK-Bestimmung mit Testbouillon auch für das Trockensekret in der Frühphase der Trokkenzeit maßgebende Werte erbringt.

6. SUMMARY

Antibacterial activity of ß-lactam-antibiotics in fresh collected bovine dry udder secretions

1. Comparative determinations of the minimal bactericidal concentration (MBC) of penicillin G, oxacillin and cephalonium against penicillinase-negative S.aureus-isolates in fresh collected dry udder secretions and in broth (DIN-method) showed that the MBCs in dry udder secretion were higher than in broth (arithmetic mean of the differences in the MBC-dilution steps of penicillin G 6,8).

   Whole milk, heated milk and heated mastitis milk in contrast to unheated mastitis milk did not produce an increase in MBC.

2. Because there was no decrease in microbiological activity of the antibiotic in dry udder secretion and nutrient broth, it was not possible to give an explanation for the different levels of MBC. Remarkable differences in the microbiological activity of the antibiotic in dry udder secretion versus nutrient broth were due to a difference in the serial dilution technique between Norm-Entwurf DIN 58940 and other methods. By using the DIN-method in dry udder secretion in comparison with nutrient broth, dry udder secretion showed to have a considerably lower microbiological activity than can be achieved by a direct method. Therefore the DIN-method cannot be suitable for determining MBC, when using dry udder secretion.

3. For serial dilution technique the MBC of penicillin G, oxacillin and cephalonium against different S.aureus strains in dry udder secretions and nutrient broth were determined by use of the direct method. MBC in dry udder secretion was also still higher than in nutrient broth when using

this new kind of determination (arithmetic mean of the differences in the MBC-dilution steps of penicillin G 5,7 and cephalonium 6,2).

4. The comparative examination of the kinetics of bactericidal activity in broth media showed a poor growth of bacteria in dry udder secretion without antimicrobic, but higher rates of survivors in this medium without antimicrobic.

5. The MICs in dry udder secretions as well as in broth, indirectly determined by counting of viable bacteria, were mostly equal or differed by as much as only one dilution step.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANTON, A.H. (1960) Relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy J.Pharmac.exp.Ther. 129, 282-290

APPLESTEIN, J.M. CROSBY, E.B. JOHNSON, W.D. KAYE, D. (1968) In vitro antimicrobial activity and human pharmacology of cephaloglycin Appl.Microbiol. 16, 1006-1010

AYNSLEY, L.H. HUGHES, D.L. (1954) Neomycin as a treatment for bovine mastitis Br.vet.J. 110, 403-410

BARRY, A.L. SABATH, L.D. (1974) In "Manual of clinical microbiology" Second Edition Washington D.C. American Society for Microbiology

BLUMBERG, P.M. STROMINGER, J.L. (1974) Interaction of penicillin with the bactericidal cell: Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes Bact.Rev. 38, 291-335

BREUER, A. STARKE, B. (1976) Untersuchung über den Einfluß von Cephradin, Cephalexin, Cefazolin, Cefacetril auf das Wachstum penicillin-resistenter Staphylokokken unveröffentl.Ergebnisse der Firma Heyden GmbH,Regensburg,Squibb International Research Center,Regensburg

CARROLL, E.J. (1961) Whey protein of drying-off-secretions, mastitic milk and colostrum saperated by ionexchange cellulose J.Dairy Sci. 44, 2194-2211

COLVILLE, J.M. QUINN, E.L. (1961) zit.nach KUNIN (1966)

CURTIS, R. HENDY, P.G. WATSON, D.J. HARRIS, A.M. DAVIES, A.M. MARSHALL, M.J. (1977) A cerate containing cephalonium for the prophylaxis of dry udder infections in dairy cows Vet.Rec. 25, 557-560

DEUBLER, M.J. (1955) Preliminary studies on Pseudomonas mastitis
COLE, E.J. Am.J.vet.Res. 16, 511-514

DIERNHOFER, K. (1950) Diagnostik der Euterentzündungen
Wien.tierärztl.Mschr. 37, 809-866

DREWS, G. (1968) Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler
Springer Verlag, Berlin,Heidelberg, New York

ERICSSON, H.M. (1971) Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study
SHERRIS, J.C. Acta path.microbiol.scand.section B, 217, 1-87

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V. FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN (FNMed) (1973) Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika, Begriffe
DIN 58940, Blatt 1

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V. FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN (FNMed) (1976) Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika, Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Bouillon-Verdünnungsmethode
DIN 58940, Teil 5

FOLEY, J.M. (1962) Screening bacterial colonies for penicillinase production
PERRET, C.J. Nature 195, 287-288

FORTH, W. (1977) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
HENSCHLER, D. Wirtschaftsverlag, Mannheim
RUMMEL, W.

GARROD, L.P. (1969) Effect of medium composition on the apparent sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to gentamycin
WATERWORTH, P.M. J.clin.Path. 22, 534-538

GEDEK, W. (1978) Penicillinase-Bildung und minimale Hemmkonzentration von Betalaktam-Antibiotika bei euterpathogenen Staphylokokken
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 91, 367-369

GILLESSEN, G.
GILLESSEN, I.M. (1960) Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen
Ergeb.Mikrobiol. 33, 128-241

GLAZ, E. (1959) zit. nach HELM (1976)

GREENWOOD, D. (1976) Unrealistic nature of the "MIC"
J.Antimicrob.Chemother. 2, 312-313

HARRIS, A.M.
MARSHALL, M.J.
CURTIS, R.
EVANS, J.M.
WATSON, D.J. (1976) Cephalosporins in the prevention and treatment of mastitis
Vet.Rec. 99, 128-129

HARWICK, H.J.
WEISS, P.
FEKETY, F.R. (1968) Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing
J.Lab.clin.Med. 72, 511-516

HELM, E.B. (1977) Antibakterielle Aktivität von Antibiotika in Körperflüssigkeiten
Johann A.Wülfing,Stresemannallee 6,
4040 Neuss 1

HERXHEIMER, H.
SCHWAB, M.
SPIER, H.W. (1975) Cephalosporine
Arzneimittelbrief, unabhängiges Informationsblatt für den Arzt
Jahrgang 9 Nr. 7, 47-50

HOU, J.P.
POOLE, J.W. (1971) ß-Laktam-Antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure
J.pharmaceut.Sci. 60, 503-532

JACKSON, G.
RUBENIS, M.
KENNEDY, B. (1961) zit. nach KUNIN (1966)

JACOBS, J.
KLASENS, M.
PENNINGS, A. (1972) Untersuchung der Charakteristika von zwei "Trockenzeitpräparaten" (holländ.)
Tijdschr.Diergeneesk. 97, 466-476

JAWETZ, E.
MELNICK, J.
ADELBERG, E. (1977) Medizinische Mikrobiologie
Springer Verlag, Berlin,Heidelberg

KHAN, N.
MARSHALL, R.T. (1969) Inhibitory effects of milk and casein on five antibiotics
J.Dairy Sci. 52, 895

KINGWILL, R.G.
NEAVE, F.K.
DODD, F.H.
GRIFFIN, T.K.
WESTGARTH, D.R. (1970) The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years
Vet.Rec. 87, 94-100

KIRBY, M.M.
ROSENFELD, L.S.
BRODIE, J. (1962) Oxacillin-laboratory and clinical evaluation
J.Am.med.Ass. 181, 739-744

KLASTERKY, J.
DANEAU, D.
SWINGS, G.
WEERTS, D. (1974) Antibacterial activity in serum and urin as a therapeutic guide in bacterial infections
J.infect.Dis. 129, 187-193

KLEIN, P. (1957) Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis
Springer-Verlag, Berlin,Göttingen, Heidelberg

KLOTZ, I.M.
URQUHART, J.M.
WEBER, W.W. (1950) Penicillin-protein complexes
Arch.Biochem. 26, 420-435

KRABBENHOFT, K.L.
ADAMS, A.P.
SCHIPPER, I.A. (1965) Antibiotics sensitivities of organisms isolated from mastitic and nonmastitic mammary secretions
Appl.Microbiol. 13, 762-765

KRADOLFER, F.
AHRENS, T.
GELZER, J.
VISCHER, W.
ZIMMERMANN, W. (1973) Experimentelle Evaluierung des neuen Cephlosporin-Antibiotikums Celospor (Cephacetril)
Schweiz.med.Wschr. 103, 711-718

KUNIN, C.M. (1961) Serum binding, distribution and excretion of 4 penicillin analogues
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 107, 337-341

KUNIN, C.M. (1964) Enhancement of antimicrobial activity of penicillins and other antibiotics in human serum by competitive serum binding inhibitors
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 117, 69-73

KUNIN, C.M. (1966) Clinical pharmacology of the new penicillins
Clin.Pharm.Therap. 7, 166-179

KUNIN, C.M. (1967) Clinical significance of protein binding of the penicillins
Ann.N.Y.Acad.Sci. 145, 282-290

KUNIN, C.M. (1970) Binding of antibiotics to tissue homogenates
J.infect.Dis. 121, 55-63

KUNIN, C.M.
BUGG, A. (1971) Binding of polymyxin antibiotics to tissues: The major determinant of distribution and persistence in the body
J.infect.Dis. 124, 394-400

KUSCHINSKY, G.
LÜLLMANN, H. (1978) Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart

MAURICE, P.N.
RIESS, W.
WELKE, A.
AMSON, K. (1973) Celospor (C 36278-Ba), ein neues Antibiotikum aus der Cephalosporinreihe: Pharmakokinetik und klinische Prüfung
Schweiz.med.Wschr. 103, 718-724

MEYER, M.C.
GUTMANN, D.E. (1968) The binding of drugs by plasma proteins
J.pharmaceut.Sci. 57, 895-918

MØLLER, K.O. (1966) Pharmakologie
Schwabe Verlag,Basel,Stuttgart

MÖSSNER, G.
BÜRKER, U.
EGETMEYER, K.A.
MAURER, H. (1969) Bakteriologische und pharmakokinetische Eigenschaften neuer oraler Cephalosporin-Verbindungen
Arzneimittelforsch. 19, 1949-1955

NATZKE, R.P.
EVERETT, R.W.
BRAY, D.R. (1975) Effect of drying off practices on mastitis infection
J.Dairy Sci. 58, 1828-1835

NEUMEISTER, E.
BAUMGARTNER, W.
FERNANDO, R.E. (1975) Über die Verweildauer und therapeutische Wirkung verschiedener Antibiotikaformulierungen nach Euterinstallation zum Zeitpunkt des Trockenstellens
Wien.tierärztl.Mschr. 62, 387-390

PEARSON, J.K.L.
WRIGHT, C.L. (1969) Dry cow therapy as a means of controlling bovine mastitis
Vet.Rec. 84, 294-298

POLLOCK, M.R. (1958) zit. nach POLLOCK (1960)

POLLOCK, M.R. (1960) Drug resistance and mechanisms for its development
Br.med.Bull. 16, 16-22

PRICE, K.E. (1969) Structure-activity relationships of semisynthetic penicillins
Adv.appl.Microbiol. 11, 17-75

PRICE, K.E.
GOUREVITCH, A.
CHENEY, L.C. (1967) Biological properties of semisynthetic penicillins, structure-activity relationships
Proc.Antimicrob.Ag.Chemother., 670-698

PRICE, K.E.
GALLIAN, M.J.
HEATHER, C.D.
LUTHER, H.G. (1955/56) The influence of milk and other media on antibiotic sensitivity of mastitis organisms
Antibiot.Ann., 753-762

PRICE, K.E.
ZOLLI, Z.
GALLIAN, M.J.
SHEA, G.J. (1957/58) Comparison of antibacterial activity of mastitis therapeutic agents by an in vitro method
Antibiot.Ann., 279-285

PUGH, K.E.
HARRIS, A.M.
MARSHALL, M.J.
EVANS, J.M. (1973) Evalution of a long-acting intramammary preparation containing high doses of penicillin and streptomycin for use in dry cows
Vet.Rec. 93, 212-216

RASMUSSEN, F. (1971) Excretion of drugs by milk
Handbook of experimental pharmacology
XXVIII, Part 1, 390-402
Springer Verlag, Berlin,Heidelberg

REITER, B.
BRAMLEY, A.J. (1975) Defence mechanisms of the udder and their relevance to mastitis control.
Proc.JDF Seminar on mastitis control
Reading University, pp. 210-222

ROLINSON, G.N.
SUTHERLAND, R. (1965) The binding of antibiotics to serum proteins
Br.J.Pharmac. 25, 638-650

ROSSELET, A.
SCHLUEP, J.
KNÜSEL, F. (1977) A quantitative in vitro evaluation of the combined action of benzylpenicillin and dihydrostreptomycin on staphylococci isolated from the bovine udder with special regard to synergistic activity
Zbl.Vet.Med.B 24, 35-52

RUSSELL, A.D. (1978) Minimum bactericidal concentrations
J.Antimicrob.Chemother. 4, 91-92

SCHEER, M. (1976) Antibakterielle Wirkung von Sisomicin im Vergleich zu Gentamycin
Arzneimittelforsch. 26, 772-778

SCHLEGEL, H.G. (1972) Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart

SCHOLTAN, W.
SCHMID, J. (1962) Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes
Arzneimittelforsch. 12, 741-750

SELWYN, S. (1976) Unrealistic nature of the MIC
J.Antimicrob.Chemother. 2, 221-222

SHAHIDI, S.A.A.
MARSHALL, R.T. (1967) Bactericidal efficiency of penicillin G in normal and abnormal milk
J.Dairy Sci. 50, 945

SHAHIDI, S.A.A.
MARSHALL, R.T. (1968) Bactericidal efficiency of penicillin G in normal and mastitis milk: Tube dilution assays
Am.J.vet.Res. 29, 1391-1396

SMITH, A.
NEAVE, F.K.
DODD, F.H. (1966) Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows
Vet.Rec. 79, 233-236

SMITH, A.
WHEELOCK, J.V.
DODD, F.H. (1967) Changes in the quantity and composition of mammary gland secretion in the dry period between lactations
J.Dairy Res. 34, 13-19

SMITH, A.
WESTGARTH, D.R.
JONES, M.R.
NEAVE, F.K.
DODD, F.H. (1967) Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows
Vet.Rec. 81, 504-510

SPENCER, J.L.
SIU, F.Y.
FLYNN, E.H.
JACKSON, B.G.
SIGAL, M.V.
HIGGINS, H.M.
CHAUVETTE, R.R.
ANDREWS, S.L.
BLOCK, D.E. (1966) Chemistry of cephalosporin antibiotics. VIII Synthesis and structure-activity relationships of cephaloridine analogues
Proc.Antimicrob.Ag.Chemother., 573-580

STROMINGER, J.L. (1965) Bacterial cell wall synthesis and
TIPPER, D.J. structure in relation to the mechanism
of action of penicillins and other
antibacterial agents
Am.J.Med. 39, 708-721

SUGINAKA, H. (1972) Multiple penicillin-binding compo-
BLUMBERG, P.M. nents in Bacillus subtilis, Bacillus
STROMINGER, J.L. cereus, Staphylococcus aureus and
Escherichia coli
J.biol.Chem. 247, 5279-5288

WALSER, K. (1973) Untersuchungen zur Behandlung sub-
FRIEDING, H. klinischer Mastitiden des Rindes mit
SCHMID, G. Isoxazolyl-Penicillinen in der Trok-
kenperiode
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 86, 101-104

WALTER, A. (1975) Antibiotika-Fibel
HEILMEYER, L. Georg Thieme Verlag Stuttgart

WATERWORTH, P. (1978) Uniformity in sensitivity test media
J.Antimicrob.Chemother. 4, 4-6

WELTY, F.K. (1976) Lactoferrin concentration during
SMITH, K.L. involution of the bovine mammary
SCHANBACHER, F.L. gland.
J.Dairy Sci. 59, 224-231

WHEELOCK, J.V. (1967) Changes in the quantity and compo-
SMITH, A. sition of mammary gland secretion
DODD, F.H. in the dry period between lactations
LYSTER, R.L.J. J.Dairy Res. 34, 1-12

WELTGESUNDHEITS- (1961) zit. nach ERICSSON und SHERRIS (1971)
ORGANISATION

WICK, W.E. (1965) In citro and in vivo laboratory
BONIECE, W.S. evaluation of cephaloglycin and
cephaloridine
Appl.Microbiol. 13, 248-253

WIESMANN, E. (1974) Medizinische Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart

WOZNIAK, L.A. (1960) Studies on binding of tetracyclines
by dog and human plasma
Proc. Soc.exp.Biol.Med. 105, 430-433

ZIV, G. (1971) The in vitro effects of pH and type of milk media on the growth of mastitis organisms as related to antibiotic sensitivity tests
Zbl.Vet.Med.B 18, 72-79

ZIV, G.
GORDIN, S. (1973) The composition of bovine udder secretion during the first half of the dry period
Zbl.Vet.Med.A 20, 285-291

ZIV, G.
SULMAN, F.G. (1972) Binding of antibiotics to bovine and ovine serum
Proc.Antimicrob.Ag.Chemother. 2, 206-213

ZIV, G.
SARAN-ROSENZUAIG, A.
GLUCKMANN, E. (1973a) Kinetic considerations of antibiotic persistence in the udders of dry cows
Zbl.Vet.Med.B 20, 425-434

ZIV, G.
SARAN-ROSENZUAIG, A.
RISENBERG, R. (1973b) Retention of antibiotics in dry-udder secretions after the infusion of several "dry cow" antibiotic products
Zbl.Vet.Med.B 20, 415-424

ZIV, G.
GORDIN, S.
BECHAR, G.
BERNSTEIN, S. (1976) Binding of antibiotics to dry udder secretion and to udder tissue homogenates
Br.vet.J. 132, 318-322

Herrn Prof.Dr.W.Gedek danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Tiergesundheitsdienstes für die stets gern gewährte Hilfe bedanken.

L e b e n s l a u f

Am 02.07.1952 wurde ich als erste Tochter von Hilde Marx, geb. Horst und Kurt Marx in Hofheim am Taunus geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Grundschulen in Hofheim am Taunus, Witterschlick bei Bonn sowie Meckenheim bei Bonn. Anschließend wurde ich in das neusprachliche Mädchengymnasium St. Josef in Rheinbach aufgenommen, wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1971/72 bis zum Sommersemester 1977 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich im August 1977 das tierärztliche Staatsexamen bestand. Die Approbation als Tierärztin erhielt ich am 30.5.1978.

Seit 15. November 1977 bin ich beim Tiergesundheitsdienst Bayern mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.